

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**EFEITO DO CLORETO DE MERCÚRIO E DO 2,3-DIMERCAPTOPROPANOL
SOBRE A ATIVIDADE DA DELTA-AMINOLEVULINATO DESIDRATASE DE
CÉREBRO, RIM E FÍGADO DE CAMUNDONGOS, *IN VIVO* E *IN VITRO***

TATIANA EMANUELLI

ORIENTADOR

PROF. DIOGO ONOFRE DE SOUZA

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas -
Bioquímica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.**

Porto Alegre

1996

ARTIGOS PUBLICADOS

0788
BIBLIOTECA SETORIAL DO

Os resultados desta dissertação geraram as seguintes publicações:

EMANUELLI, T.; ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E.; PORCIÚNCULA, L.O.; MORSCH, V.M.; MARTINS, A.F. E SOUZA, D.O.G. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinate dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. Pharmacol. Toxicol. No prelo.

EMANUELLI, T.; ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E.; NASCIMENTO, P.C.; BEBER, F.A.; SOUZA, D.O.G. Mechanism of ALA-D inhibition by dimercaprol involves chelation of zinc from the less tightly site of the enzyme. Submetido ao Biochem. J.

Trabalhos publicados em temas relacionados com esta dissertação:

ROCHA, J.B.T.; FREITAS, A.J.; MARQUES, M.B.; PEREIRA, M.E.; *EMANUELLI, T.*; SOUZA, D.O. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid post-natal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinate dehydratase of suckling rats. Braz. J. Med. Biol. Res. 26:1077-1083 (1993).

ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E.; *EMANUELLI, T.*; CHRISTOFARI, R.S.; SOUZA, D.O. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid post-natal brain growth on ALA-D activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. Toxicology 100:27-37 (1995).



Ao Zeca, pela paciência, carinho e apoio,
sem os quais não teria sido possível a
realização desta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Aos Profs. João Batista e Ester, pela amizade, estímulo à pesquisa e pela orientação, imprescindíveis à realização deste trabalho.

Ao Prof. Diogo, meu orientador, pela amizade e pela confiança em mim depositada, ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Paulo Nascimento, do Departamento de Química da UFSM, pela orientação durante a realização das análises polarográficas.

À Prof^a. Vera Morsch, do Departamento de Química da UFSM, pela realização das análises de mercúrio.

Aos colegas de grupo, Aninha, Andréa, Carla, João Cavedini e Patrícia, pelo carinho com o qual me acolheram, e de forma especial ao Alexandre Freitas pelo auxílio e amizade.

Aos bolsistas de iniciação científica que colaboraram para este trabalho : Soraya Antoni, Nilda Barbosa, Lisiane de Oliveira Porciúncula, Flávio A. Beber e Jefferson Wollsmeider.

A todos que de alguma forma, contribuíram para a realização desta dissertação.

SUMÁRIO

	Página
1.0 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - A enzima delta-aminolevulinato desidratase (ALA-D).....	1
1.1.1 - Histórico e função.....	1
1.1.2 - Estrutura e características.....	4
1.1.3 - Ação catalítica.....	6
1.1.4 - O papel do zinco.....	7
1.2 - Mercúrio.....	10
1.2.1 - Estados do mercúrio.....	10
1.2.2 - Fontes para exposição humana.....	10
1.2.3 - Cinética e metabolismo.....	11
1.2.3.1 - Absorção.....	11
1.2.3.2 - Distribuição.....	12
1.2.3.3 - Biotransformação.....	13
1.2.3.4 - Excreção.....	14
1.2.4 - Valores de referência.....	15
1.2.5 - Efeitos tóxicos do mercúrio.....	15
1.2.6 - Efeitos neurotóxicos do mercúrio.....	16
1.2.7 - Mecanismo de toxicidade do mercúrio.....	17
1.3 - 2,3 - Dimercaptopropanol (BAL).....	18
1.4 - Objetivos.....	20
2.0 - MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.1 - Material.....	22
2.1.1 - Reagentes.....	22

2.1.2 - Animais experimentais.....	22
2.2 - Métodos.....	22
2.2.1 - Determinação da DL ₅₀ para 3 doses de cloreto de mercúrio.....	23
2.2.2 - Intoxicação com cloreto de mercúrio e tratamento com 2,3 - dimercaptopropanol (BAL).....	23
2.2.2.1 - Tratamento dos animais.....	23
2.2.2.2 - Peso seco renal.....	23
2.2.2.3 - Determinação de uréia.....	25
2.2.2.4 - Determinação da distribuição tecidual de mercúrio.....	25
2.2.2.5 - Determinação da atividade da ALA-D <i>in vivo</i>	25
2.2.2.6 - Determinação de proteínas.....	26
2.2.3 - Experimentos realizados <i>in vitro</i>	26
2.2.3.1 - Preparação tecidual.....	26
2.2.3.2 - Determinação da atividade da ALA-D <i>in vitro</i>	27
2.2.3.3 - Efeito do 2,3 - dimercaptopropanol e do HgCl ₂ sobre a atividade da ALA-D <i>in vitro</i>	27
2.2.3.4 - Determinação da concentração de zinco livre.....	28
2.2.3.5 - Determinação da taxa de oxidação do 2,3 - dimercaptopropanol.....	28
2.2.3.6 - Purificação parcial da ALA-D.....	29
2.2.3.7 - Reativação da ALA-D parcialmente purificada.....	29
2.2.3.8 - Determinação de proteínas	30
2.2.4 - Análise estatística.....	30

3.0 - RESULTADOS.....	31
3.1 - Intoxicação com cloreto de mercúrio e tratamento com BAL	31
3.1.1 - Peso corporal e peso dos órgãos dos animais tratados.....	31
3.1.2 - Atividade da delta-aminolevulinato desidratase.....	31
3.1.3 - Uréia sérica	31
3.1.4 - Dosagem de mercúrio tecidual.....	37
3.2 - Efeito do BAL e do HgCl ₂ sobre a atividade da ALA-D <i>in vitro</i>	37
3.2.1 - Cérebro.....	37
3.2.2 - Rim.....	43
3.2.3 - Fígado.....	43
3.3 - Mecanismo de inibição da ALA-D pelo BAL.....	44
3.3.1 - Papel do zinco na inibição da ALA-D pelo BAL	44
3.3.2 - Papel da oxidação do BAL no seu efeito inibitório sobre a ALA-D.....	52
3.3.2.1 - Participação de espécies ativas de oxigênio na inibição da ALA-D pelo BAL.....	60
3.3.3 - Efeito do BAL na atividade da ALA-D parcialmente purificada.....	68
4.0 - DISCUSSÃO.....	76
4.1 - Intoxicação com cloreto de mercúrio e tratamento com BAL.....	76
4.2 - Efeito do BAL e do HgCl ₂ sobre a atividade da ALA-D <i>in vitro</i>	77
4.3 - Mecanismo de inibição da ALA-D pelo BAL.....	79
4.3.1 - Papel do zinco na inibição da ALA-D pelo BAL.....	79
4.3.2 - Papel da oxidação do BAL no seu efeito inibitório sobre a ALA-D.....	80
4.3.3 - Participação de espécies ativas de oxigênio na inibição da ALA-D pelo BAL.....	82

4.3.4 - Efeito do BAL na atividade da ALA-D parcialmente purificada.....	82
5.0 - CONCLUSÕES.....	85
6.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Reação catalisada pela enzima delta-aminolevulinato desidratase.....	2
Figura 2 - Via de biossíntese dos compostos tetrapirrólicos.....	3
Figura 3 - Estrutura química do 2,3-dimercaptopropanol (BAL).....	19
Figura 4 - Efeito de 3 injeções subcutâneas de HgCl ₂ (3-9 mg/kg) sobre a mortalidade de camundongos verificada até 48 horas após a última injeção.....	24
Figura 5 - Conteúdo de mercúrio cerebral, renal e hepático de camundongos injetados com 3 doses de HgCl ₂ 0, 2,3 ou 4,6 mg/kg e uma dose de BAL 0 ou 0,25 mmol/kg.....	38
Figura 6 - Efeito do BAL (0, 100, 250 e 500 µM) e do HgCl ₂ (0, 1, 4, 10, 40, 100 e 400 µM), sobre a atividade da ALA-D cerebral, <i>in vitro</i> , sem pré-incubação (A) e com 10 min de pré-incubação (B).....	39
Figura 7 - Efeito do BAL (0, 100, 250 e 500 µM) e do HgCl ₂ (0, 1, 4, 10, 40, 100 e 400 µM), sobre a atividade da ALA-D renal, <i>in vitro</i> , sem pré-incubação (A) e com 10 min de pré-incubação (B).....	40
Figura 8 - Efeito do BAL (0, 100, 250 e 500 µM) e do HgCl ₂ (0, 1, 4, 10, 40, 100 e 400 µM), sobre a atividade da ALA-D hepática, <i>in vitro</i> , sem pré-incubação (A) e com 10 min de pré-incubação (B).....	41
Figura 9A - Efeito do BAL (0, 100, 250 e 500 µM) e do ZnCl ₂ (0, 5, 25, 50 e 100 µM), sobre a atividade da ALA-D cerebral, <i>in vitro</i> , com 10 min de pré-incubação.....	45
Figura 9B - Efeito do BAL (0, 100, 250 e 500 µM) e do ZnCl ₂ (0, 5, 25, 50 e 100 µM), sobre a atividade da ALA-D renal, <i>in vitro</i> , com 10 min de pré-incubação.....	46
Figura 9C - Efeito do BAL (0, 100, 250 e 500 µM) e do ZnCl ₂ (0, 5, 25, 50 e 100 µM), sobre a atividade da ALA-D hepática, <i>in vitro</i> , com 10 min	47

de pré-incubação.....	
Figura 10A - Concentração de zinco livre em uma solução de tampão fosfato de potássio 76 mM, pH 6,4, na presença de 500 μ M de BAL reduzido, 20 μ M de EDTA, 500 μ M de cisteína ou 500 μ M de BAL oxidado, após sucessivas adições de ZnCl ₂	48
Figura 10B - Polarogramas obtidos com sucessivas adições de ZnCl ₂ a uma solução contendo 500 μ M de BAL e 76 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6,4.....	49
Figura 11 - Efeito do EDTA (0, 10, 18, 25, 33, 40 e 100 μ M) sobre a atividade da ALA-D hepática, <i>in vitro</i> , com 10 min de pré-incubação, na presença de DTT 10 mM ou BAL 1 mM.....	50
Figura 12A - Efeito do DTT (0, 10, 50, 100, 200, 500 μ M e 10 mM) e do BAL (0, 0,5 e 1,0 mM) sobre a atividade da ALA-D cerebral, <i>in vitro</i> , com 10 min de pré-incubação.....	53
Figura 12B - Efeito do DTT (0, 10, 50, 100, 200, 350, 500 μ M e 10 mM) e do BAL (0, 0,5 e 1,0 mM) sobre a atividade da ALA-D renal, <i>in vitro</i> , com 10 min de pré-incubação.....	54
Figura 12C - Efeito do DTT (0, 10, 50, 100, 200, 350, 500 μ M e 10 mM) e do BAL (0, 0,5 e 1,0 mM) sobre a atividade da ALA-D hepática, <i>in vitro</i> , com 10 min de pré-incubação.....	55
Figura 13 - Efeito dos sobrenadantes (S ₁) de cérebro, rim e fígado sobre a velocidade de oxidação do BAL (500 μ M), nas mesmas condições utilizadas no ensaio para ALA-D.....	56
Figura 14A - Efeito do EDTA (5 mM) sobre a velocidade de oxidação do BAL na ausência e na presença do sobrenadante (S ₁) de cérebro, nas mesmas condições utilizadas no ensaio para ALA-D.....	57
Figura 14B - Efeito do EDTA (5 mM) sobre a velocidade de oxidação do BAL na ausência e na presença do sobrenadante (S ₁) de rim, nas mesmas condições utilizadas no ensaio para ALA-D.....	58
Figura 14C - Efeito do EDTA (5 mM) sobre a velocidade de oxidação do BAL na ausência e na presença do sobrenadante (S ₁) de fígado, nas mesmas condições utilizadas no ensaio para ALA-D.....	59

- Figura 15A - Efeito do $ZnCl_2$ (0, 50, 100, 250 e 500 μM) sobre a velocidade de oxidação do BAL (500 μM) em ausência de sobrenadantes teciduais, nas mesmas condições utilizadas no ensaio para ALA-D..... 61
- Figura 15B - Efeito do $ZnCl_2$ (0, 50, 100, 250 e 500 μM) sobre a velocidade de oxidação do BAL (500 μM) na presença do sobrenadante (S_1) de cérebro, nas mesmas condições utilizadas no ensaio para ALA-D.. 62
- Figura 15C - Efeito do $ZnCl_2$ (0, 50, 100, 250 e 500 μM) sobre a velocidade de oxidação do BAL (500 μM) na presença da preparação tecidual (S_1) de rim, nas mesmas condições utilizadas no ensaio para ALA-D..... 63
- Figura 15D - Efeito do $ZnCl_2$ (0, 50, 100, 250 e 500 μM) sobre a velocidade de oxidação do BAL (500 μM) na presença do sobrenadante (S_1) de fígado, nas mesmas condições utilizadas no ensaio para ALA-D..... 64
- Figura 16 - Efeito do H_2O_2 (0, 0,25, 0,5 e 1 mM) sobre a atividade da ALA-D cerebral, renal e hepática, sem pré-incubação (A) e com 10 min de pré-incubação (B)..... 65
- Figura 17 - Efeito do BAL (0, 0,5, 1, 4, 10 e 29 mM) sobre a atividade da ALA-D de fígado de camundongos parcialmente purificada (P_{55}), não reativada, incubada no ar ou sob atmosfera de argônio, com 10 min de pré-incubação..... 70
- Figura 18 - Efeito do BAL (0, 0,5, 1 e 4 mM) sobre a atividade da ALA-D de fígado de camundongos parcialmente purificada (P_{55}), reativada, incubada no ar ou sob atmosfera de argônio, com 10 min de pré-incubação..... 71
- Figura 19 - Efeito do BAL (0, 0,5, 1, 4, 10 e 29 mM) sobre a atividade da ALA-D de fígado de camundongos (S_1), incubada no ar ou sob atmosfera de argônio, com 10 min de pré-incubação..... 72
- Figura 20 - Efeito do BAL (0, 0,5, 1 e 4 mM) sobre a atividade da ALA-D de rim de camundongos parcialmente purificada (P_{55}), reativada, incubada no ar ou sob atmosfera de argônio, com 10 min de pré-

incubação.....	74
Figura 21 - Efeito do BAL (0, 0,5, 1 e 4 mM) sobre a atividade da ALA-D de fígado bovino purificada (Sigma Co.), reativada, incubada no ar ou sob atmosfera de argônio, com 10 min de pré-incubação.....	75

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Peso corporal de camundongos adultos tratados por 3 dias com cloreto de mercúrio e por 1 dia com BAL 0,25 mmol/kg (sc).....	32
Tabela 2 - Peso do órgão e razão peso do órgão/peso corporal de camundongos adultos, tratados por 3 dias com cloreto de mercúrio, e 1 dia com BAL 0,25 mmolo/kg (sc).....	33
Tabela 3 - Efeito de 3 doses de HgCl ₂ e uma dose de BAL 0,25 mmol/kg sobre o peso seco renal de camundongos adultos.....	34
Tabela 4 - Atividade a ALA-D cerebral, renal e hepática de camundongos adultos expostos a cloreto de mercúrio e tratados com BAL 0,25 mmol/kg (sc).....	35
Tabela 5 - Efeito de 3 doses de HgCl ₂ e uma dose de BAL 0,25 mmol/kg sobre a concentração de uréia sérica de camundongos adultos.....	36
Tabela 6 - IC ₅₀ para a inibição da ALA-D cerebral, renal e hepática por cloreto de mercúrio, na presença de concentrações crescentes de BAL, in vitro.....	42
Tabela 7 - Efeito do H ₂ O ₂ e do radical hidroxil sobre a atividade da ALA-D de cérebro, rim e fígado de camundongos adultos, com 10 min de pré-incubação.....	66
Tabela 8 - Efeito da superóxido dismutase (SOD), NADH e manitol na inibição da ALA-D pelo BAL.....	67
Tabela 9 - Efeito do NADH, manitol e superóxido dismutase (SOD) na taxa de oxidação do BAL (500 μM), nas mesmas condições utilizadas nos ensaios para ALA-D.....	69

ABREVIATURAS

ALA	- ácido delta-aminolevulínico, ácido 5-aminolevulínico ou delta aminolevulinato.
ALA-D	- delta-aminolevulinato desidratase, porfobilinogênio sintetase ou 5-aminolevulinato hidrolíase.
ANOVA	- análise de variância
BAL	- 2,3-dimercaptopropanol ou dimercaprol.
DME	- eletrodo gotejante de mercúrio (“dropping mercuric electrode”).
DOVA	- γ - δ -dioxovalerato.
DTNB	- ácido 5-5' ditiobis(2-nitrobenzóico) = reagente de Ellman.
DTT	- DL-ditiotreitól.
DL ₅₀	- dose capaz de matar 50% dos animais.
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético.
EP	- erro padrão.
GSH	- glutatião reduzido.
IC ₅₀	- concentração do inibidor que reduz a atividade enzimática a 50% da atividade original.
K _m	- constante de Michaelis-Menten.
NADH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida.
PBG	- porfobilinogênio.
SOD	- superóxido dismutase.
sc	- subcutânea.
TCA	- ácido tricloroacético.
V _{máx}	- velocidade máxima.

RESUMO

O dimercaprol (BAL ou 2,3-dimercaptopropanol) é um quelante utilizado no tratamento de intoxicações com mercúrio. No entanto, este composto apresenta baixa eficácia terapêutica. É suposto que a ação terapêutica do BAL ocorra através da remoção de mercúrio ligado a proteínas sulfidrílicas. No presente estudo investigou-se o efeito inibitório do tratamento com cloreto de mercúrio (3 dias com 2,3 ou 4,6 mg/kg de HgCl₂, *sc*) sobre a atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (ALA-D) de cérebro, rim e fígado de camundongos adultos, e uma possível reversão dos efeitos do mercúrio com dimercaprol (0,25 mmol/kg, 24 horas após a última injeção de mercúrio). O cloreto de mercúrio, nas doses injetadas, não inibiu a atividade da ALA-D cerebral. O tratamento com dimercaprol não foi capaz de reverter a inibição de 25% causada por 4,6 mg/kg de HgCl₂ na atividade da ALA-D hepática. A inibição da ALA-D renal por 4,6 mg/kg de cloreto de mercúrio (35% de inibição) foi potencializada após o tratamento com dimercaprol (65% de inibição). Após exposição a 2,3 ou 4,6 mg/kg de cloreto de mercúrio, o conteúdo de mercúrio renal aumentou e atingiu níveis maiores do que nos outros órgãos. Só houve acúmulo de mercúrio no fígado após a exposição a 4,6 mg/kg de HgCl₂ e o tratamento com dimercaprol aumentou a deposição do metal neste órgão. O tratamento com dimercaprol também aumentou a deposição de mercúrio no cérebro dos animais expostos a 4,6 mg/kg de HgCl₂. A sensibilidade ao efeito combinado do HgCl₂ e do dimercaprol, *in vitro*, foi similar nas enzimas de todos os tecidos estudados. Sem pré-incubação, o dimercaprol, até 500 µM, potencializou o efeito inibitório do cloreto de mercúrio sobre a atividade da ALA-D. Com pré-incubação, 100 a 250 µM de dimercaprol aumentou a sensibilidade da ALA-D ao mercúrio, enquanto que 500 µM de dimercaprol protegeu parcialmente a atividade da ALA-D da inibição por mercúrio. O dimercaprol (500 µM) inibiu a atividade da ALA-D renal e hepática, quando pré-incubado com essas enzimas. Durante a determinação do mecanismo de inibição da ALA-D pelo BAL, foram obtidas evidências de que os dois sítios de ligação de zinco da ALA-D possuem funções diferentes na enzima de camundongos. O zinco ligado ao sítio mais lábil parece estar envolvido na estabilização da ALA-D no estado reduzido, enquanto que o zinco mais firmemente ligado à enzima seria essencial para a atividade da

ALA-D. Desse modo, o BAL (até 1 mM) inibiria a ALA-D através da remoção de íons zinco ligados ao sítio lábil, tornando a enzima mais suscetível à oxidação. A potencialização causada pelo BAL na inibição da ALA-D por HgCl_2 , poderia ser atribuída ao deslocamento de zinco do sítio mais lábil, aumentando a vulnerabilidade dos grupos -SH da enzima à oxidação por mercúrio. Os dados obtidos neste estudo sugerem que o BAL não é capaz de reverter a inibição da enzima sulfidrídica ALA-D por mercúrio; e que na verdade, o BAL *per se* pode apresentar um efeito inibitório sobre a atividade da enzima, dependendo do tecido. Além disso, o dimercaprol pode potencializar o efeito inibitório do mercúrio sobre a atividade dessa enzima.

ABSTRACT

Dimercaprol (BAL or 2,3-dimercaptopropanol) is a compound used in the treatment of mercury intoxication, but presents low therapeutic efficacy. It is assumed that dimercaprol acts by reactivating target sulfhydryl-containing proteins. In the present investigation we studied in mice the inhibitory effect of mercuric chloride treatment (3 days with 2.3 or 4.6 mg/kg HgCl₂, *sc*) on cerebral, renal and hepatic delta-aminolevulinate dehydratase (ALA-D) activity, and a possible reversal of the effect of mercury by dimercaprol (0.25 mmol/kg, 24 hours after the last mercury injection). Mercuric chloride did not inhibit cerebral ALA-D at the doses injected. Dimercaprol treatment did not restore the normal enzyme activity of the liver after the 25% inhibition caused by 4.6 mg/kg HgCl₂. In the kidney, dimercaprol enhanced the inhibitory effect of 4.6 mg/kg mercuric chloride (from 35% after mercury treatment alone to 65% after mercury plus dimercaprol treatment). Mercury content increased in kidney after exposure to 2.3 or 4.6 mg/kg and the levels attained were higher than in any other organ. Mercury accumulated in liver only after exposure to 4.6 mg/kg HgCl₂, and dimercaprol further increased mercury deposition. Dimercaprol treatment also increased the levels of mercury in brain of animals exposed to 4.6 mg/kg HgCl₂. The enzymes from all sources presented similar sensitivity to the combined effect of HgCl₂ and dimercaprol *in vitro*. In the absence of pre-incubation, 0 - 500 μM dimercaprol potentiated the inhibitory effect of HgCl₂ on ALA-D activity. In the presence of pre-incubation, 100 and 250 μM dimercaprol enhanced ALA-D sensitivity to mercury, whereas 500 μM dimercaprol partially protected the enzyme from mercury inhibition. Dimercaprol (500 μM) inhibited renal and hepatic ALA-D when pre-incubated with the enzymes. While investigating the mechanism of ALA-D inhibition by BAL we provided some evidences indicating that the two zinc binding sites of mice ALA-D have different functions. Zinc bound to the less tightly metal-site seems to be involved in ALA-D stabilization in a reduced state, while the zinc more tightly bound would be essential for ALA-D activity. Accordingly BAL (up to 1mM) would inhibit ALA-D by removing zinc bound to the less tightly metal-site, rendering the enzyme more susceptible to oxidation. The potentiation caused by BAL on ALA-D inhibition by HgCl₂ could also be attributed to the displacement of zinc from the

less tightly site, increasing the vulnerability of -SH groups from ALA-D to oxidation by mercury. The data obtained in this study suggest that BAL did not act by reactivating mercury-inhibited sulfhydryl-containing ALA-D, and that indeed it may have an inhibitory effect *per se* depending on the tissue. Furthermore, dimercaprol may potentiate the inhibitory effect of mercury on this enzyme.

1.0 - INTRODUÇÃO

1.1- A enzima delta-aminolevulinato desidratase (ALA-D)

1.1.1- Histórico e função

A enzima citosólica delta-aminolevulinato desidratase (ALA-D) (E.C. 4.2.1.24), também conhecida como porfobilinogênio sintetase ou 5-aminolevulinato hidrolase foi isolada na década de 50 (DRESEL & FALK, 1953; GIBSON et al., 1955).

Esta enzima catalisa a condensação de duas moléculas de ácido delta-aminolevulínico, com perda de 2 moléculas de água, para formar o composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG) (Figura 1).

A reação catalisada pela ALA-D faz parte da via de biossíntese dos compostos tetrapirrólicos (corrinas, bilinas, clorofilas e hemes) (Figura 2). A grande importância destes compostos reside na sua função como grupos prostéticos de proteínas. O heme (ferroprotoporfirina) faz parte da estrutura de proteínas que participam do transporte de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), transporte de elétrons (citocromos a, b e c), reações de transformação de xenobióticos (citocromo P₄₅₀) e do sistema de proteção contra peróxidos (catalases e peroxidases). Existem evidências de que a ALA-D poderia ser a etapa limitante na via de biossíntese do heme (BORRALHO et al., 1989; BORRALHO, 1990).

A via para biossíntese das porfirinas é semelhante em bactérias, vegetais e animais, encontrando-se portanto, a enzima ALA-D, amplamente distribuída na natureza (BELLINASSO, 1985; AMAZARRAY, 1986; RODRIGUES, 1987). Em mamíferos os tecidos que apresentam maior atividade enzimática são fígado, rim e os tecidos hematopoiéticos. (GIBSON et al., 1955)

Recentemente, GUO et al. (1994) relataram que a enzima delta-aminolevulinato desidratase é idêntica ao inibidor de proteosoma de 240-kDa (CF-2).

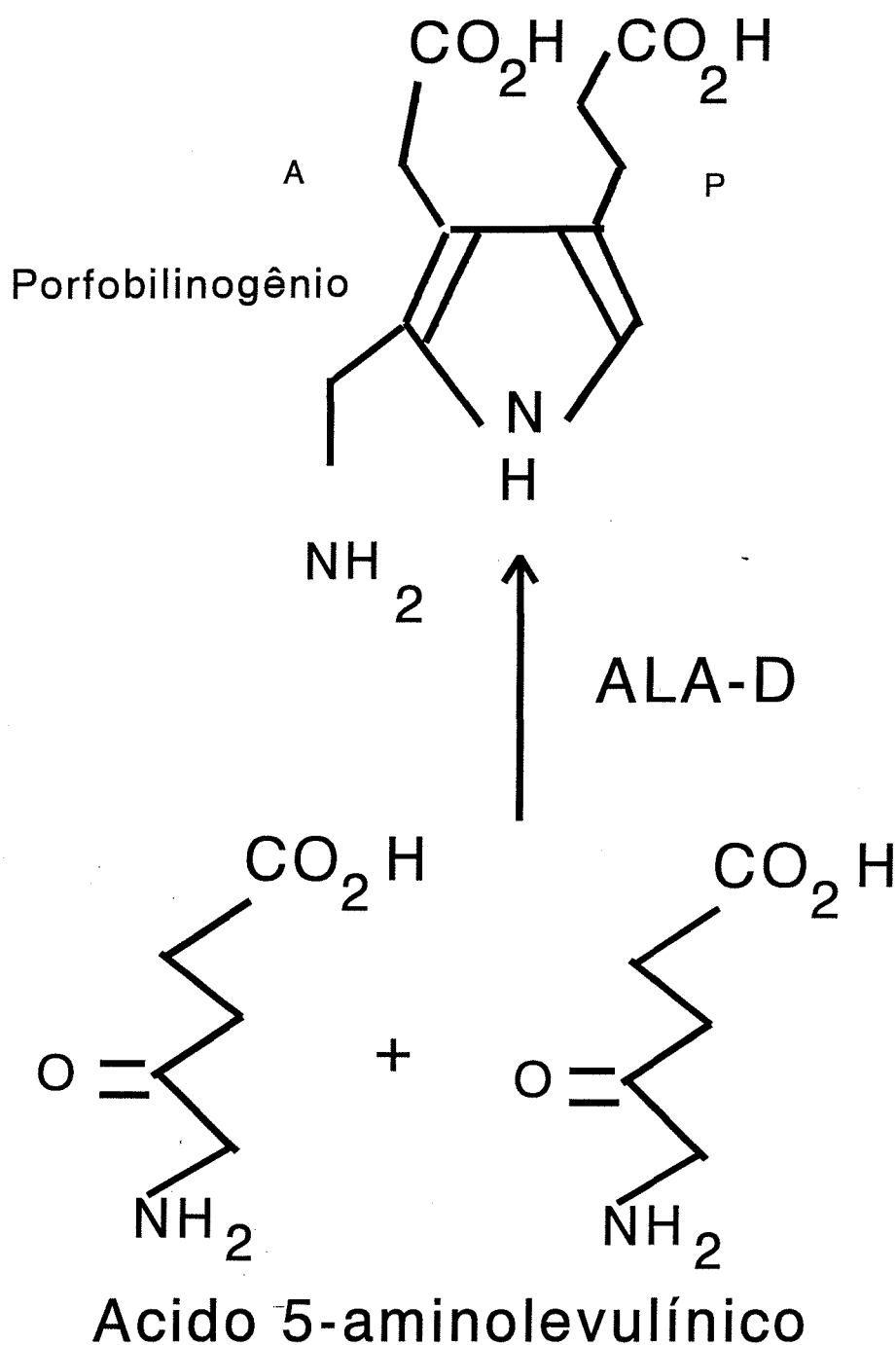
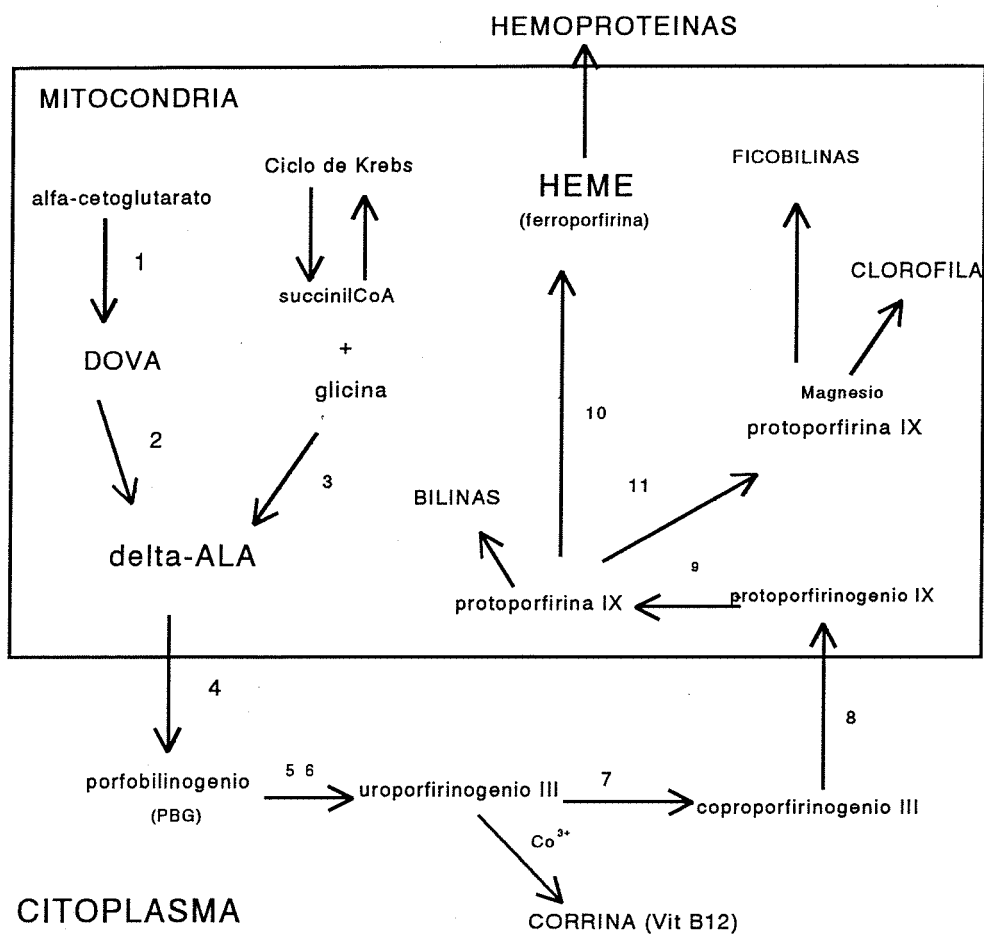


FIGURA 1 - Reação catalisada pela enzima delta aminolevulinato desidratase (ALA-D).
 A: Cadeia lateral ácido acético ($-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$) originária da segunda molécula de substrato, a qual se liga ao sítio A (ácido acético) de ligação do substrato. P: Cadeia lateral ácido propiônico ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), originária da primeira molécula de substrato, a qual forma uma base de Schiff com um resíduo lisil no sítio P (ácido propiônico) de ligação do substrato (JORDAN & GIBBS, 1985; SPENCER & JORDAN, 1995).



- 1.Redutase
- 2.DOVA-transaminase
3. δ -ALA sintetase
4. δ -ALA desidratase
- 5.Uroporfirinogênio I sintetase
- 6.Uroporfirinogênio III cossintase
- 7.Uroporfirinogênio descarboxilase
- 8.Coproporfirinogênio oxidase
- 9.Protoporfirinogênio oxidase
- 10.Ferro-quelatase
- 11.Magnésio-quelatase

FIGURA 2 - Via de biossíntese dos compostos tetrapirrólicos. Obs: A compartimentalização mitocôndria e citoplasma refere-se à biossíntese do heme.

Estes achados sugerem que a ALA-D poderia ter uma importância adicional, uma vez que os proteosomas atuam na degradação de proteínas anormais, fatores de transcrição, oncoproteínas, ciclinas, bem como no processamento de antígenos.

1.1.2- Estrutura e características

A enzima delta-aminolevulinato desidratase de fígado bovino possui peso molecular de 280.000 Da (TIGIER et al., 1970; WU et al., 1974; SHEMIN, 1976; FUJITA et al., 1981), sendo composta por 8 subunidades de 35.000 Da cada uma (WILSON et al., 1972; WU et al., 1974; SHEMIN, 1976; FUJITA et al., 1981), arranjadas em uma estrutura cúbica octamérica, com simetria diédrica (WU et al., 1974).

Todas as enzimas ALA-D isoladas até o momento requerem um íon metálico divalente para estarem ativas e são inibidas por EDTA. Apesar do grande grau de similaridade existente entre os genes da ALA-D provenientes de diversos organismos (humano, WETMUR et al., 1986; *Escherichia coli*, ECHELARD et al., 1988; LI et al., 1989; ervilha, BOESE et al., 1991; espinafre, SCHAUMBURG et al., 1991), a enzima requer metais diferentes para a ativação, de acordo com a sua fonte (zinco para ALA-D de mamíferos e magnésio para ALA-D de plantas, SHEMIN, 1976).

A ALA-D de mamíferos requer zinco para estar ativa. Quando isolada, esta enzima liga 8 Zn^{2+} /octâmero (TSUKAMOTO et al., 1979; BEVAN et al., 1980; SOMMER & BEYERSMANN, 1984). No entanto existe controvérsia quanto ao número de átomos de zinco que seria necessário para a atividade máxima da enzima, com este número variando entre 4 e 8 (SHEMIN, 1976; BEVAN et al., 1980; TSUKAMOTO et al., 1980; JAFFE et al., 1984).

A ALA-D, independente da sua fonte, é uma enzima de natureza sulfidrílica (SHEMIN, 1976; TSUKAMOTO et al., 1979; BEVAN et al., 1980), sendo, portanto, inibida por agentes bloqueadores de grupos tiólicos, tais como N-etilmaleimida (NEM), iodoacetato (BATLLE et al., 1967; CHAUDHRY et al., 1976; JORDAN et al., 1976; BARNARD et al., 1977), paracloromercuriobenzoato (PCMB),

monoiodoacetamida (IAM) e ácido 5-5' ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) (BARREIRO, 1967; BATLLE et al., 1967; WILSON et al., 1972; BARNARD et al., 1977); e por metais pesados que possuem elevada afinidade por grupamentos sulfidrílicos, tais como chumbo, cobre e mercúrio (GIBSON et al., 1955; WILSON et al., 1972; FINELLI et al., 1975; RODRIGUES, 1987; RODRIGUES et al., 1989, 1996; BORRALHO et al., 1990; ROCHA et al., 1993; ROCHA et al., 1995). A clonagem e sequenciamento do cDNA da ALA-D de eritrócitos de camundongos revelou a presença de 8 cisteínas e 9 histidinas por subunidade (BISHOP et al., 1989).

A enzima é facilmente inativada durante a purificação e a perda de atividade está diretamente relacionada à oxidação de 2 grupos sulfidril/subunidade. Geralmente é necessária a adição de ativadores tiólicos, como por exemplo: ditioneitol (DTT), β -mercaptoetanol, cisteína e glutatião, para obtenção da atividade catalítica máxima. Entretanto, quando a enzima é isolada na presença de zinco (TSUKAMOTO et al., 1979) e de um agente redutor (GIBSON et al., 1955; TSUKAMOTO et al., 1979; BEVAN et al., 1980), em condições anaeróbicas, ela apresenta atividade máxima mesmo sem a adição de um ativador tiólico no meio de incubação (TSUKAMOTO et al., 1979).

O pH ótimo para determinação da atividade da ALA-D varia desde 6,2 até 9,5, de acordo com a sua fonte (BARREIRO, 1967; HODSON et al., 1977). A enzima de origem animal apresenta valores mais baixos de pH ótimo (GRANICK & MAUZERALL, 1958; GIBSON et al., 1955) que a de origem vegetal. A atividade máxima da enzima geralmente é observada com temperaturas de incubação entre 55 e 65°C (TIGIER et al., 1968; WILSON et al., 1972; BELLINASSO, 1985). Os valores de K_m (constante de Michaelis-Menten) variam entre 0,14 mM para a enzima de fígado bovino (GIBSON et al., 1955) até 6,6 mM para folhas de *Ricinus communis* ("mamona") (AMAZARRAY, 1986).

A curva de velocidade da reação em função da concentração de substrato para a ALA-D de origem animal apresenta um perfil sigmóide, indicando um caráter alostérico da enzima (CHINARRO et al., 1983; VERGNANO et al., 1968),

enquanto que a ALA-D de *Saccharomyces cerevisiae* exibe uma cinética tipicamente michaeliana (BORRALHO et al., 1990).

O gene estrutural para ALA-D humana está localizado na região cromossômica 9q13→qter (WETMUR et al., 1986). Até o momento foram identificadas 3 isoenzimas diferentes em humanos, designadas ALA-D 1-1, ALA-D 1-2 e ALA-D 2-2 (BATTISTUZZI et al., 1981; PETRUCCI et al., 1982), resultantes da expressão de 2 alelos comuns ALAD¹ e ALAD². Recentemente, foi observado que indivíduos portadores do alelo ALAD² apresentam um maior conteúdo de chumbo no organismo e maior risco de intoxicação por este metal, possivelmente devido a uma maior afinidade da enzima pelo chumbo, determinada por este alelo (WETMUR, 1994).

1.1.3- Ação catalítica

O sítio ativo da enzima parece ser composto de dois resíduos de cisteína, um átomo de zinco, um resíduo de histidina, um ou dois resíduos de lisina e resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (TSUKAMOTO et al., 1979; CHINARRO et al., 1983).

Estudos utilizando substrato radioativo ([5-¹³C]ALA, JORDAN & SEEHRA, 1980; [5-¹⁴C]ALA, JORDAN & GIBBS, 1985) demonstraram que o grupo ε-amino de um resíduo lisil (lisina-252 na ALA-D humana, GIBBS & JORDAN, 1986) presente no sítio ativo forma uma base de Schiff com a primeira molécula de substrato, a qual origina a cadeia lateral P (ácido propiônico) da molécula de porfobilinogênio (Figura 1), enquanto que uma ligação não-covalente ocorre com a outra molécula de ALA, que originará a cadeia lateral A (ácido acético) (Figura 1). A ALA-D possui 8 subunidades. No entanto, apenas metade das subunidades parece estar envolvida na catálise (SHEMIN, 1976; JAFFE & HANES, 1986), ocorrendo o fenômeno de "half-site reactivity" (SEYDOUX et al., 1974).

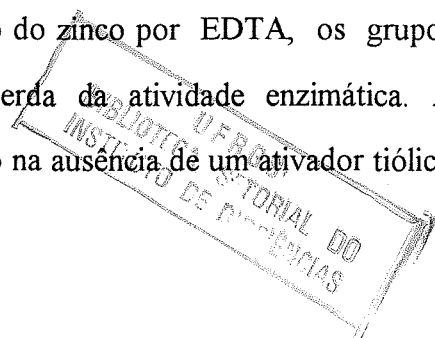
Atualmente sabe-se que 3 tipos diferentes de aminoácidos são essenciais para a atividade da ALA-D:

- a- um resíduo de lisina, ao qual se liga a primeira molécula de substrato, através de uma base de Schiff (NANDI, 1978; GIBBS & JORDAN, 1986);
- b- um resíduo de histidina, o qual pode sofrer fotooxidação, reduzindo tanto a atividade enzimática quanto a ligação ao zinco (TSUKAMOTO et al., 1979). Este resíduo poderia participar no mecanismo de transferência de prótons do meio aquoso ao sítio ativo hidrofóbico (BATLLE & STELLA, 1978);
- c- dois resíduos de cisteína, os quais devem estar reduzidos para que a enzima apresente atividade (CHEH & NEILANDS, 1976). Estes resíduos são altamente reativos (GIBBS et al., 1985), podendo formar uma ponte dissulfeto em presença de ar, formar mercaptídeos por reação com metais pesados ou ser modificados por reagentes químicos. A oxidação desses resíduos leva à inativação da enzima com concomitante perda do zinco ligado (TSUKAMOTO et al., 1979).

1.1.4- O papel do zinco

A atividade da ALA-D é inibida por quelantes, como EDTA (ácido etileno-diaminotetracético) e 1,10-fenantrolina (CHEH & NEILANDS, 1976; SOMMER & BEYERSMANN, 1984). Esta inibição, na enzima de mamíferos, pode ser revertida pela ligação de 4 íons zinco/octâmero (BEVAN et al., 1980), demonstrando que o zinco faz parte da estrutura da enzima. Os resultados contraditórios de TSUKAMOTO et al. (1979) demonstrando que o Zn^{2+} não é essencial para a atividade catalítica da enzima, uma vez que a apoenzima de fígado bovino preparada e mantida sob condições estritamente anaeróbicas apresenta atividade máxima, podem ser devido a presença de uma concentração de zinco contaminante (1-2 μM) maior que a concentração da enzima (0,5 μM) no ensaio (SPENCER & JORDAN, 1993).

A ALA-D é uma metaloenzima algo atípica, pois o Zn^{2+} frequentemente é perdido durante a sua purificação. Após a remoção do zinco por EDTA, os grupos -SH da enzima são facilmente oxidados, com perda da atividade enzimática. A apoenzima oxidada obtida então, não incorpora zinco na ausência de um ativador tiólico



(TSUKAMOTO et al., 1979; BEVAN et al., 1980). Entretanto, isto não é obrigatoriamente uma evidência de que o zinco está ligado a grupamentos sulfidrila, uma vez que a redução de uma ponte dissulfeto poderia estar abrindo uma fenda através da qual o Zn^{2+} poderia entrar e se ligar a outros grupamentos.

Em 1990, DENT et al. verificaram a existência de 2 sítios estruturalmente distintos para ligação do zinco na ALA-D bovina. Um deles seria composto por 5 ligantes: 2 ou 3 histidinas, 1 ou nenhum oxigênio de um grupo como tirosina ou uma molécula de solvente, 1 tirosina ou aspartato e 1 SH de cisteína. Este tipo de sítio estaria envolvido na ligação das 4 moléculas de zinco essenciais para a completa ativação da ALA-D. Um segundo tipo seria composto por 4 cisteínas e estaria envolvido na ligação dos outros 4 átomos de zinco não essenciais. O primeiro sítio tem sido designado sítio A e o segundo sítio B. A ALA-D de *E. coli* apresenta 2 mol Zn^{2+} /mol de subunidade, possuindo dois sítios diferentes de ligação para o metal, sítios alfa e os sítios beta (SPENCER & JORDAN, 1994, 1995). A presença de dois sítios diferentes para ligação do metal podem indicar mais de uma função para os íons metálicos (Zn^{2+} na enzima de origem animal e Mg^{2+} na enzima de origem vegetal), possivelmente catalítica e estrutural (SPENCER & JORDAN, 1993).

O papel do zinco na atividade da ALA-D ainda não está completamente elucidado. Algumas evidências sugerem uma função catalítica direta. A determinação dos parâmetros cinéticos da ALA-D em presença e em ausência de EDTA (quelante de cátions divalentes, entre eles zinco), revelou que a remoção de zinco aumenta consideravelmente o K_m (60 vezes), mas altera pouco o valor de V_{max} (reduz para a metade do valor inicial) (SOMMER & BEYERSMANN, 1984). BEYERSMANN & COX (1984) demonstraram que existe uma grande proximidade entre o sítio para zinco e o sítio de ligação do substrato, pois o substrato protege a ALA-D da inibição por ácido 2-bromo-3-(5-imidazolil) propiônico, um reagente com afinidade por zinco. SPENCER & JORDAN (1995), demonstraram que a ligação da segunda molécula de substrato ao sítio A (originará a cadeia lateral ácido acético) da ALA-D de *E. coli* depende da presença de metal ligado ao sítio alfa. No entanto, várias outras evidências

apontam para uma função estrutural do zinco na ALA-D. A atividade da ALA-D não é influenciada por agentes, tais como cianeto e outros ligantes aniônicos, capazes de modificar a atividade de outras enzimas, nas quais o zinco possui um papel catalítico. A 1,10-fenantrolina inibe lentamente a ALA-D, e altas concentrações de EDTA (1 mM) são necessárias para inativar completamente a enzima de fígado bovino (SOMMER & BEYERSMANN, 1984). Além disso, uma interação direta entre zinco e substrato parece pouco provável, pois:

a- o ácido levulínico, um análogo do ALA, se liga também na apoenzima (BEVAN et al., 1980);

b- a retirada de zinco da ALA-D não alterou a fluorescência do isoindol formado pela ligação cruzada de grupos amino (lisina) e sulfidril (cisteína) no sítio ativo da enzima (BLOCK et al., 1990);

c- uma análise da coordenação do zinco na enzima, por EXAFS ("extended-X-ray-absorption-fine-structure spectroscopy") revelou apenas alterações mínimas após a adição de substrato (HASNIAN et al., 1985) ou produto (DENT et al., 1990).

Assim, atualmente, a maioria dos resultados favorecem a hipótese de que o zinco possua um papel estrutural, protegendo grupos -SH essenciais da autoxidação (TSUKAMOTO et al., 1979; GIBBS et al., 1985) e/ou contribuindo para dar ao sítio ativo uma conformação que seria necessária para a correta coordenação da segunda molécula de substrato com a primeira, controlando, assim, a formação do PBG (BLOCK et al., 1990).

Segundo BORDER et al. (1976), tanto a enzima ativa, quanto a enzima inibida por EDTA apresentam uma massa molecular de 280.000 Da, descartando-se um papel do zinco na união das subunidades.

Em 1986, WETMUR et al. determinaram a sequência da ALA-D humana a partir do cDNA. Através da sequência de aminoácidos deduziu-se que uma das cisteínas altamente reativas (Cys 223) está localizada na região que supostamente liga zinco e que corresponde a uma sequência de consenso para os chamados "zinc fingers", nas "DNA binding proteins" (BERG, 1986). Estas evidências reforçam as conclusões

de TSUKAMOTO et al. (1979), de que a função do Zn^{2+} seria proteger 2 grupos -SH essenciais da autoxidação, possivelmente por coordenação.

1.2 - Mercúrio

1.2.1 - Estados do mercúrio

O mercúrio pode ser encontrado tanto na forma inorgânica quanto orgânica. O mercúrio inorgânico apresenta-se em três estados diferentes: Hg^0 (metálico ou elementar), Hg_2^{++} (mercuroso), e Hg^{2+} (mercúrico). Os estados mercuroso e mercúrico podem formar numerosos compostos químicos inorgânicos e orgânicos. As formas orgânicas do mercúrio são aquelas nas quais este elemento apresenta-se ligado a pelo menos um átomo de carbono.

1.2.2 - Fontes para exposição humana

Com a substituição dos compostos de mercúrio, antigamente usados como diuréticos, bactericidas, antisépticos, laxantes e unguentos, por tratamentos mais específicos e eficazes, os casos de intoxicação mercurial por drogas reduziram-se. Assim sendo, atualmente, a população em geral está primariamente exposta ao mercúrio através das amálgamas dentárias (BRUNE & EVJE, 1985; VIMY & LORSCHIEDER, 1985a,b; FRIBERG & NYLANDER, 1987; NYLANDER et al., 1987; ARONSSON et al., 1989; VIMY et al., 1990; LORSCHIEDER et al., 1995) e da dieta. Dependendo do nível de contaminação, o ar e a água também podem se tornar importantes fontes de exposição. O uso de combustíveis de origem fóssil aumentou os níveis de mercúrio no ar.

Estudos de SIBBETT et al. (1972) detectaram a liberação de vapor de mercúrio em casas cujas paredes haviam sido pintadas com tinta contendo compostos de

mercúrio. Estes compostos são adicionados em tintas látex à base de água para evitar o desenvolvimento de bactérias e mofo.

O mercúrio está geralmente presente nos alimentos na sua forma inorgânica e em concentrações abaixo do limite de detecção (20 ng/g peso úmido). No entanto, em peixes e outros alimentos de origem aquática, a forma predominante é o metilmercúrio e seus níveis podem ser maiores que 1,2 mg/kg.

A exposição ocupacional ao mercúrio inorgânico ocorre não somente em fábricas de álcalis clorados e na indústria eletrônica, mas também em fábricas de matérias plásticas, termômetros, fungicidas, germicidas e em consultórios odontológicos.

Outra fonte importante de exposição a este metal é o garimpo, onde o mercúrio metálico é usado para separar o ouro. Nestes casos, além da exposição ocupacional aos vapores de mercúrio, a contaminação dos rios com este metal poderá provocar a intoxicação de populações ribeirinhas pela ingestão de peixes contaminados. O mercúrio inorgânico depositado nos sedimentos de rios, lagos e oceanos pode ser metilado por microorganismos, originando o metilmercúrio, que é mais prontamente captado e mais lentamente excretado pelos organismos. O metilmercúrio é rapidamente absorvido pelas algas de plâncton, concentrando-se, em seguida, nos peixes, ao longo da cadeia alimentar. Assim, o mercúrio é acumulado pelos organismos vivos. Mesmo em níveis baixos de contaminação aquática pode-se encontrar altos níveis do metal em peixes maiores (parte superior da cadeia alimentar).

1.2.3 - Cinética e Metabolismo

1.2.3.1 - Absorção

O mercúrio elementar (Hg^0) é absorvido principalmente (80%) por inalação dos seus vapores. Uma vez dissolvido na corrente sanguínea, o mercúrio

metálico é rapidamente oxidado a Hg^{2+} nos eritrócitos e, após a difusão para outros tecidos, pela ação da catalase (MAGOS et al., 1978).

A absorção do mercúrio metálico e do cloreto mercurioso é baixa por via oral. Por outro lado, 10% dos sais de mercúrio divalente, e 90% do metil mercúrio administrados são absorvidos através do trato gastrointestinal humano (KLAASSEN, 1996). A absorção em ratos jovens é consideravelmente maior que em adultos (KOSTIAL et al., 1978, 1983).

Apesar de serem escassos os dados sobre absorção de mercúrio através da pele, alguns estudos em animais revelaram um certo grau de absorção de sais mercúricos (FRIBERG et al., 1961; SKOG & WAHLBERG, 1964; WAHLBERG, 1965), bem como sais de fenil mercúrio (CLARKSON, 1972).

1.2.3.2 - Distribuição

Os níveis teciduais de mercúrio vão depender da forma química de mercúrio a qual o indivíduo foi exposto. O mercúrio divalente não atravessa facilmente a barreira hematoencefálica ou a placenta (BERLIN & JOHANSSON, 1964; BERLIN et al., 1969; WHO, 1976). O padrão de distribuição do mercúrio varia ainda com a espécie e a idade (JUGO, 1976) do animal exposto ao metal.

A distribuição do mercúrio inorgânico é muito heterogênea e é relativamente semelhante, tanto após exposição por via endovenosa quanto após a exposição por via oral. Tanto em animais quanto em humanos o mercúrio apresenta afinidade por células epiteliais e glândulas, se acumulando, por exemplo, na tireóide, pituitária, cérebro, rim, fígado, pâncreas, testículos, ovários e próstata (WHO, 1991).

O rim é o órgão que apresenta maior acúmulo do metal (50-90%), tanto após a administração de vapor de mercúrio metálico, quanto após a administração de sais inorgânicos de mercúrio (WHO, 1991). O mercúrio concentra-se principalmente no córtex renal, nas células dos túbulos proximais (CLARKSON, 1972; ZALUPS & BARFUSS, 1990; ZALUPS, 1991).

Após exposição a nitrato mercúrico, foram observados níveis renais de mercúrio 300 vezes maiores que os sanguíneos, e uma concentração cerebral aproximadamente 10 vezes maior que a sanguínea (SWENSSON & ULFVARSON, 1968).

O mercúrio se deposita em todas as regiões cerebrais. No entanto, o padrão de deposição varia com o tempo após a exposição, pois algumas regiões cerebrais, tais como córtex e núcleo dentatus eliminam mais rapidamente o metal do que regiões como corpo caloso, medula e células mercuriofilicas do tronco cerebral (CLARKSON, 1972).

Nos rins a principal fração do mercúrio ligado a proteínas está combinado com metalotioneínas. As metalotioneínas são proteínas responsáveis pela ligação de cádmio no tecido renal (KAGI & VALLEE, 1960). Estas proteínas apresentam uma massa molecular de aproximadamente 10.000 - 11.000, ausência de aminoácidos aromáticos e alto conteúdo de cisteína. Elas possuem um papel protetor, uma vez que os níveis normais de metalotioneína renal em ratos são equivalentes em capacidade de ligar mercúrio ao nível de mercúrio renal associado com o início dos efeitos tóxicos (CLARKSON, 1972). O mercúrio é capaz de induzir a síntese de metalotioneína em rim, mas não em fígado (CLARKSON, 1972).

1.2.3.3 - Biotransformação

O mercúrio pode sofrer várias transformações metabólicas:

- * oxidação do vapor de mercúrio metálico a mercúrio divalente (MAGOS et al., 1978; OGATA & IKEDA, 1978; OGATA et al., 1979);
- * redução do mercúrio divalente a mercúrio metálico;
- * metilação do mercúrio inorgânico;
- * conversão do metilmercúrio a mercúrio inorgânico divalente (SYVERSEN, 1974; YAMAMOTO, 1986; LIND et al., 1988; WHO, 1991).

* dissociação do íon mercurioso formando um átomo de mercúrio elementar e um átomo de íon mercúrico (HAND et al., 1943).

Assim sendo, após a administração de mercúrio elementar ou orgânico poderemos ter mercúrio divalente no organismo interagindo com diversas biomoléculas. Após a administração de mercúrio divalente a animais e humanos, parte do metal é reduzido a Hg^0 (WHO, 1976; DUNN et al., 1978, 1981a,b; SUGATA & CLARKSON, 1979), sendo eliminado, parte pelos pulmões e o restante pela pele ou pelo couro. No entanto, até o momento, não existem evidências de que ocorra metilação do mercúrio em tecidos de humanos ou de outros mamíferos (WHO, 1976). A metilação do mercúrio é um processo mediado por bactérias e que ocorre no meio ambiente, parecendo ocorrer também no intestino de peixes.

1.2.3.4 - Excreção

A cinética de excreção do mercúrio varia com a espécie do animal e com a forma química do mercúrio ao qual ele foi exposto. ROTHSTEIN & HAYES (1959) relataram que após administração de uma única dose subtóxica de $HgCl_2$ a ratos, o metal foi excretado em 3 fases: uma fase inicial rápida, que dura poucos dias (35% da dose); uma fase mais lenta, durando 30 dias (50% da dose); e uma fase lenta, que dura 100 dias (15% da dose). Estes resultados sugerem que ratos expostos diariamente ao mercúrio acumulariam o metal ao longo da sua vida. A meia-vida do Hg^{2+} no organismo é de aproximadamente 60 dias (FRIBERG & VOSTAL, 1972). Entretanto essa meia-vida varia de acordo com o tecido e com o tempo após a exposição. Tanto em cérebro (LIND et al., 1988) quanto em rim, observou-se que uma fração do mercúrio inorgânico apresenta um tempo de meia-vida consideravelmente longo.

Uma pequena fração do mercúrio inorgânico absorvido é exalada como vapor de mercúrio metálico formado pela redução do Hg^{2+} nos tecidos (DUNN et al., 1978), mas a urina e as fezes são as principais vias de eliminação (WHO, 1976). A eliminação fecal é a mais importante do ponto de vista quantitativo (NORSETH &

CLARKSON, 1971; KLAASSEN, 1976). A rota urinária predomina quando há uma exposição a altas doses do metal (KRISTENSEN & HANSEN, 1980).

1.2.4 - Valores de referência

Em humanos os valores normais de mercúrio no sangue oscilam entre 3 e 4 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (KLAASSEN, 1996) e no cabelo entre 1 e 2 mg/kg . O limite superior de mercúrio na urina da população normal é aproximadamente 5 $\mu\text{g}/\text{dl}$. No entanto existe uma considerável variação individual, que pode ser atribuída à exposição por amálgama dentária e ao consumo de peixe.

1.2.5 - Efeitos tóxicos do mercúrio

A resposta obtida após exposição a uma determinada dose de mercúrio pode ser alterada por fatores tais como idade (JUGO, 1976; KOSTIAL et al., 1978, 1988), sexo (TANAKA et al., 1991), estado nutricional e sensibilização por exposição oral. A DL_{50} para o HgCl_2 observada após a administração parenteral a camundongos é em torno de 10 mg/kg .

Doses altas e agudas de mercúrio, independente da forma química, provocam desnaturação de proteínas (inativando enzimas) e transtornos severos em qualquer tecido com o qual entre em contato. A toxicidade aguda se caracteriza por choque, colapso cardiovascular, falência renal aguda e severo dano gastrointestinal nos casos de exposição oral (TROEN et al., 1951).

A exposição ao mercúrio pode afetar a reprodução (LEE & DIXON, 1975; WATANABE et al., 1982; CHOWDHURY et al., 1986), possui efeitos teratogênicos e embriotóxicos (HOLT & WEBB, 1986; GALE & FERM, 1971), além de provocar distúrbios auto-imunes (BARIETY et al., 1971; DRUET et al., 1978, 1982; WEENING et al., 1978; PELLETIER et al., 1987).

1.2.6 - Efeitos neurotóxicos do mercúrio

Alguns dos sintomas iniciais da intoxicação crônica com vapor de mercúrio, tais como aumento da irritabilidade, perda de memória, redução da autoconfiança, tremores, eretismo e insônia estão associados a alterações no sistema nervoso central (PIIKIVI et al., 1984). A intoxicação com mercúrio orgânico produz lesões características no córtex occipital e na camada granular do cerebelo (TAKEUCHI et al., 1962), por outro lado o mercúrio inorgânico, apesar de se depositar no sistema nervoso central e causar decréscimos na performance comportamental, produz poucas alterações morfológicas neste tecido.

A exposição, tanto *in vitro* quanto *in vivo* ao mercúrio inorgânico provocou reduções significativas na ADP-ribosilação da tubulina e da actina em cérebro de ratos (PALKIEWICS, 1994), demonstrando que o cloreto de mercúrio pode alterar reações neuroquímicas envolvidas na manutenção da integridade estrutural da membrana neuronal. Existem evidências de que o mercúrio entra nas células nervosas através dos canais de sódio e cálcio, e que exerce sua ação neurotóxica num sítio intracelular, possivelmente envolvendo grupos -SH (MIYAMOTO, 1983).

O metil mercúrio, *in vitro*, inibe a captação de dopamina, serotonina e noradrenalina por sinaptossomas de cérebro de ratos, estimula a liberação espontânea dessas monoaminas, de sinaptossomas previamente carregados (KOMULAINEN & TUOMISTO, 1981), e reduz a união de antagonistas a receptores dopaminérgicos estriatais do tipo D₂ (KOMULAINEN et al., 1985). No entanto, estes efeitos não foram observados *in vivo*, mesmo após a administração de doses tóxicas deste metal (KOMULAINEN & TUOMISTO, 1985). *In vivo*, o metil mercúrio altera a atividade de enzimas responsáveis pela síntese e catabolismo de neurotransmissores, tais como colina acetiltransferase, acetilcolinesterase, tirosina hidroxilase e monoamina oxidase (OMATA et al., 1982).

O efeito neurotóxico do mercúrio também pode estar relacionado a deposição do metal nos astrócitos, causando alterações no funcionamento dessas células, o que poderia afetar os neurônios (RÖNNBÄCK & HANSSON, 1992). O cloreto de mercúrio inibe a captação de glutamato por astrócitos de camundongos, o que

sugere que o mercúrio poderia causar alterações neurodegenerativas através da excitotoxicidade do glutamato (BROOKES, 1988; 1989).

1.2.7 - Mecanismos de toxicidade do mercúrio

Um possível mecanismo para a toxicidade do mercúrio é a alteração de atividades enzimáticas por ligação a grupos -SH (VALLEE & ULMER, 1972; OEHME, 1978). Entretanto, até o momento não se conseguiu demonstrar a existência de uma única lesão responsável pela iniciação da toxicidade celular. Além disso, é provável que essa lesão não seja encontrada, pois devido à natureza ubíqua dos grupamentos sulfidrila nas proteínas, o mercúrio é altamente inespecífico em termos de suas associações protéicas (ROTHSTEIN, 1971). Assim, já foi demonstrado que o mercúrio inibe as enzimas: aspartato aminotransferase, alfa-hidroxiacetato desidrogenase, lactato desidrogenase, ornitina carbamil transferase (HILL & SOARES, 1984), delta-aminolevulinato desidratase (ROCHA et al., 1993, 1995), e outras. O mercúrio combina-se ainda com outros grupamentos de importância fisiológica, tais como grupos fosforil, carboxil, amino e amido.

Os efeitos do mercúrio sobre o sistema imune também participam na sua toxicidade. Atribui-se o dano renal a uma reação auto-imune, que resulta na formação de anticorpos contra o tecido glomerular (GOYER, 1985), e à deposição de mercúrio nas células tubulares renais.

Além disso, o mercúrio divalente pode atravessar a membrana das células nervosas através de canais de sódio e cálcio, causando uma despolarização irreversível e um aumento na liberação de neurotransmissor. Subsequentemente, ocorre um bloqueio irreversível da liberação de neurotransmissor (MIYAMOTO, 1983).

Outro possível mecanismo de toxicidade poderia estar relacionado à reação do mercúrio com moléculas de DNA e RNA, demonstrada *in vitro*. Essa reação pode alterar a estrutura terciária dessas moléculas (EICHHORN & CLARK, 1963; GRUENWEDEL & DAVIDSON, 1966), além de provocar quebras no DNA

(CANTONI et al., 1982, 1984A, 1984B; CHRISTIE et al., 1984, 1986) e inibir os mecanismos de reparo do DNA (CANTONI & COSTA, 1983). Além disso, o mercúrio é capaz de inibir a síntese protéica *in vitro* (NAKADA et al., 1980).

O mercúrio também pode interferir com a estrutura de membrana, *in vitro* (GANSER & KIRSCHNER, 1985), causando lesões e reduzindo a síntese lipídica em células nervosas (CLOEZ et al., 1987).

1.3 - 2,3-Dimercaptopropanol (BAL)

O BAL (British antilewisite, dimercaprol ou 2,3-dimercaptopropanol) (Figura 3) foi desenvolvido na Inglaterra, durante a segunda guerra mundial, como antídoto para gases de combate, tais como gás mostarda e lewisite (PETERS & STOCKEN, 1945). Estes gases contêm arsênico e provocam a formação de vesículas sobre a pele. O BAL é capaz de reverter e prevenir a inibição do sistema piruvato desidrogenase cerebral por arsênico e aumentar a excreção de arsênico em animais intoxicados (PETERS & STOCKEN, 1945). Apartir de então, intensificaram-se os estudos sobre o BAL e ele passou a ser recomendado para o tratamento de intoxicações agudas com a maioria dos metais pesados (As, Bi, Sb, Pb, Cu, Au, mercúrio inorgânico) (LONGCOPE & LUETSCHER, 1946; PERRY & JACOBSEN, 1984; KAZANTZIS, 1986; ELLENHORN, 1988; MOLINA et al., 1989; HILMY et al., 1991; ROSES et al., 1991; SAXENA et al., 1991; SLIKKERVEER et al., 1992, KLAASSEN, 1996).

Os agentes mais potentes para tratamento de intoxicações com mercúrio são os compostos sulfidrílicos. Atualmente o tratamento recomendado após intoxicação com mercúrio inorgânico consiste na administração de BAL nos casos mais severos, e de D-penicilamina nos casos mais leves (SNODGRASS et al., 1981; MANT et al., 1987; KANLUEN & GOTTLIEB, 1991; SCHWARTZ et al., 1992; SINGER et al., 1994; KLAASSEN, 1996). Estas duas substâncias complexam o mercúrio e aumentam sua velocidade de excreção renal e biliar (JUGO, 1980; KOJIMA et al., 1989; SHIMADA et al., 1993).

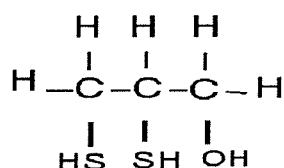


FIGURA 3 - Estrutura química do 2,3-dimercaptopropanol (BAL).

O BAL é um líquido incolor, oleoso e deve ser administrado dissolvido em óleo de amendoim, por injeção intramuscular profunda (AGNER & JANS, 1978; KLAASSEN, 1996). Os preparados farmacêuticos usam óleo como solvente, tendo em vista a instabilidade do BAL em solução aquosa.

Assim como outros compostos tiólicos, o BAL é facilmente oxidado *in vitro* (BARRON et al., 1947) e possivelmente também *in vivo*. Devido a sua lipossolubilidade o BAL apresenta distribuição intra e extracelular, sendo excretado rapidamente (em aproximadamente 4 horas), tanto pela via biliar, quanto pela via urinária. O mercúrio excretado na urina e na bile de ratos tratados com BAL aparece principalmente (90%) na forma de Hg-GSH (SHIMADA et al., 1993), o que foi atribuído a maior constante de afinidade deste complexo (log K= 41,6) quando comparada a do complexo Hg-BAL (log K= 25,74).

Entretanto, o tratamento com BAL apresenta alguns efeitos adversos, tais como aumento da pressão arterial sistólica e diastólica, taquicardia, náuseas, vômitos e dores de cabeça (APOSHEAN, 1983).

Existem relatos de que paralelamente ao aumento da excreção de mercúrio, o tratamento com BAL pode promover a redistribuição deste metal para o cérebro (EYBL et al., 1973; WANNAG & AASETH, 1980; AASETH et al., 1982),

rins (GABARD, 1976), coração e pulmões (KIYOZUMI et al., 1988; KOJIMA et al., 1989).

Além disso, o BAL possui um baixo índice terapêutico devido a sua alta toxicidade (CHISOLM, 1970). A DL_{50} do BAL para camundongos é aproximadamente 0,8 mmol/kg (ZVIRBLIS & ELLIN, 1976; CANTILENA & KLAASSEN, 1981).

Assim sendo, nos últimos anos o uso do BAL vem sendo questionado devido ao surgimento de drogas aparentemente menos tóxicas (AASETH, 1983; INNS et al., 1990; INNS & RICE, 1993), tais como o DMSA (ácido 2,3-dimercaptosuccínico) (BLUHM et al., 1992) e o DMPS (2,3-dimercaptopropano-L-sulfonato) (NIELSEN & ANDERSEN, 1991; MAIORINO et al., 1991; GOMEZ et al., 1994). Estes compostos são análogos químicos do BAL, mas apresentam uma maior solubilidade em água, limitada solubilidade lipídica, além de serem efetivos quando administrados por via oral (APOSHIAN, 1983). O DMPS é usado há muitos anos na antiga URSS e na Alemanha como antídoto em intoxicações com mercúrio. No entanto, nos EUA, com exceção do uso do DMSA em intoxicações crônicas e agudas com chumbo, aprovado em 1990 pelo FDA ("Food and Drug Administration"), o uso dessas drogas continua sendo experimental (NIELSEN & ANDERSEN, 1991; APOSHIAN et al., 1995).

1.4 - Objetivos

A enzima ALA-D é inibida por cloreto de mercúrio tanto *in vivo* quanto *in vitro* (ROCHA et al., 1995), havendo evidências de que a inibição dessa enzima possui um papel na toxicidade do mercúrio. A atividade metabólica do sistema nervoso central é extremamente elevada, sendo um sistema essencialmente aeróbico. Seu metabolismo mitocondrial é intenso, razão pela qual a síntese dos grupos heme dos citocromos da cadeia respiratória é uma etapa fundamental para as células deste sistema. A inibição da ALA-D pode prejudicar a rota de biossíntese do heme, o que por sua vez pode ter consequências patológicas (FISCHBEIN et al., 1982; SASSA et al., 1989; GOERING, 1993). O acúmulo do substrato da ALA-D, ácido delta-aminolevulínico, pode estar implicado na superprodução de espécies ativas de oxigênio (MONTEIRO et

al., 1989; PEREIRA et al., 1992; BECHARA et al., 1993). Além disso, foi demonstrado que o ALA é um potente agonista do ácido gama-aminobutírico nos receptores pré-sinápticos, podendo contribuir para um efeito neurotóxico desta substância (BRENNAN & CANTRILL, 1979; KAPPAS et al., 1983). Por outro lado, mesmo que a ALA-D não participe dos mecanismos primários de toxicidade do mercúrio, a sua avaliação pode servir como parâmetro para verificar o estado geral de intoxicação, como se usa em casos de intoxicação com chumbo (HERNEBERG et al., 1970; HIRANO et al., 1983).

Apesar de estar bem estabelecido que o tratamento com BAL é capaz de aumentar a excreção biliar e urinária de mercúrio, tanto em animais, quanto em humanos, existem poucos estudos sobre a capacidade do BAL de remover o mercúrio já ligado a grupos -SH de proteínas (ANNER et al., 1990; CHETTY, et al., 1992).

Assim sendo, os objetivos do presente estudo são:

- 1- verificar a sensibilidade do sistema nervoso central de camundongos à intoxicação com cloreto de mercúrio, utilizando como parâmetro a atividade da ALA-D;
- 2- comparar a sensibilidade da ALA-D cerebral, com a da ALA-D renal e hepática, ao cloreto de mercúrio, *in vitro* e *in vivo*, em camundongos adultos;
- 3- verificar o efeito do tratamento com 2,3-dimercaptopropanol (BAL) sobre a atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (ALA-D) de cérebro, rim e fígado de camundongos adultos expostos subcutaneamente a cloreto de mercúrio;
- 4- verificar o efeito concomitante do BAL e do cloreto mercúrio sobre a atividade da ALA-D de cérebro, rim e fígado de camundongos adultos, *in vitro*;
- 5- tendo em vista que o BAL apresentou um efeito inibitório sobre a atividade da ALA-D, além de potencializar o efeito inibitório do cloreto de mercúrio sobre a atividade dessa enzima, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, foi colocado ainda como objetivo, investigar o mecanismo pelo qual este composto estava inibindo a ALA-D.

2.0 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material

2.1.1 - Reagentes

Ácido acético glacial, ácido ascórbico, ácido etilenodiaminotetracético, ácido orto-fosfórico 85%, ácido perclórico 70%, cloreto de ferro II, cloreto de mercúrio, etanol 95%, fosfato de potássio dibásico, fosfato de potássio monobásico, sulfato de amônio foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Ácido delta-aminolevulínico-hidrocloreto, delta-aminolevulinato desidratase purificada de fígado bovino (suspensão em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,5 M, fosfato de potássio 50 mM e ditioneitol 0,1 mM, pH 6,8), ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico), cloreto de zinco, 2,3-dimercaptopropanol, p-dimetilaminobenzaldeído, DL-ditioneitol, foram obtidos da Sigma Co. (Saint Louis, MO, USA). Ácido nítrico 65%, ácido tricloroacético e carbonato de sódio foram obtidos da Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Cloreto de sódio foi obtido da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O 2,3-dimercaptopropanol oxidado (99,3% de oxidação) foi obtido deixando-se uma solução 10 mM do composto reduzido em temperatura ambiente.

2.1.2 - Animais experimentais

Foram utilizados camundongos adultos pesando entre 30 e 40 g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Maria e do Instituto de Pesquisas Biológicas (Porto Alegre). Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura controlada (22-25°C), iluminação natural, e alimentação (Guabi-RS) e água *ad libitum*. Nos experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos machos enquanto que nos experimentos *in vitro* foram utilizados indistintamente machos e fêmeas.

2.2 - Métodos

2.2.1 - Determinação da DL₅₀ para 3 doses de cloreto de mercúrio

Para determinação da DL₅₀ os camundongos foram injetados por 3 dias consecutivos com uma dose subcutânea de HgCl₂ (3, 4, 4,5, 6, 6,5, 7, 7,25, 7,5, 8 e 9 mg/kg). A percentagem de camundongos mortos foi verificada até 48 horas após a última injeção de metal. A DL₅₀ para três doses de HgCl₂ calculada de acordo com o método de LITCHFIELD & WILCOXON (1949), foi de 6,9 mg/kg (Figura 4). Para os estudos subsequentes foram utilizadas doses equivalentes a 1/3 e 2/3 da DL₅₀.

2.2.2 - Intoxicação com cloreto de mercúrio e tratamento com 2,3-dimercaptopropanol (BAL)

2.2.2.1 - Tratamento dos animais

Os animais receberam uma injeção diária de HgCl₂ 0, 2,3 ou 4,6 mg/kg (10 ml/kg de peso corporal) por 3 dias consecutivos. No quarto dia eles receberam uma injeção de BAL 0 ou 0,25 mmol/kg (10 ml/kg de peso corporal), sendo esta equivalente a aproximadamente 1/3 da DL₅₀ (KOJIMA et al., 1989). As soluções de BAL e HgCl₂ foram preparadas em NaCl 120 mM e tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0.

Os camundongos foram anestesiados com éter e mortos por decapitação, aproximadamente 24 horas após a injeção de BAL. Cérebro, rim e fígado foram removidos, pesados e utilizados para determinação da atividade da ALA-D, e da distribuição de mercúrio.

2.2.2.2 - Peso seco renal

Como os animais expostos ao cloreto de mercúrio apresentaram um aumento no peso renal, os rins de alguns dos camundongos tratados foram utilizados para determinação do conteúdo de água e do peso seco. Os animais foram mortos, os rins removidos, pesados e mantidos a 100°C até atingirem peso constante.

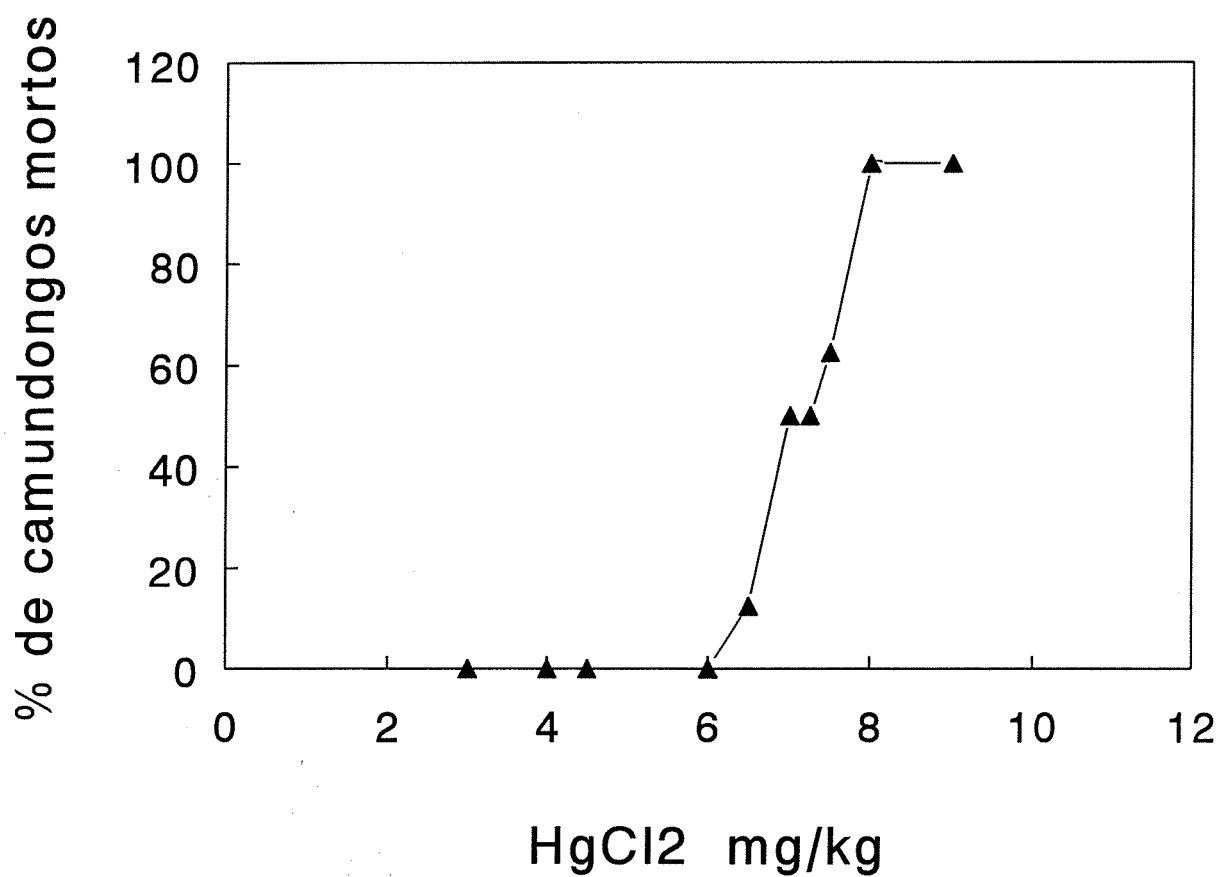


FIGURA 4 - Efeito de 3 injeções diárias, subcutâneas de HgCl₂ (3-9 mg/kg) na mortalidade de camundongos verificada até 48 horas após a última injeção (n=5-7 por dose).

2.2.2.3 - Determinação de uréia

O sangue dos animais tratados com HgCl₂ e BAL foi coletado e utilizado para determinação da uréia sérica, a qual foi realizada com um kit comercial (DOLES - Goiás). A concentração de uréia sérica é utilizada como um parâmetro para avaliar o funcionamento renal (DASTON et al., 1983).

2.2.2.4 - Determinação da distribuição tecidual de mercúrio

O cérebro, os rins e o fígado dos animais tratados por 3 dias com HgCl₂ 0, 2,3 ou 4,6 mg/kg e por 1 dia com BAL 0 ou 0,25 mmol/kg foram removidos e congelados (-20°C). Antes da determinação do conteúdo de mercúrio, as amostras de cérebro, rim e fígado foram descongeladas e receberam 10, 5 e 15 ml de HNO₃ (65%) e 1, 0,5 e 1,5 ml de peridrol (30%), respectivamente. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 24 horas e então foram aquecidas a 45°C, em banho de areia por seis horas ou até a sua completa digestão. As amostras foram filtradas e o volume foi ajustado para 25 ml com HNO₃ 0,5% (p/v). Esta solução foi utilizada para a determinação do conteúdo de mercúrio. Todas as análises foram realizadas utilizando-se 10 ml de HNO₃ 1,5% (p/v) e uma alíquota apropriada da amostra (50-100 µl). Todos os reagentes utilizados eram do mais alto grau analítico disponível. O conteúdo de mercúrio das amostras foi determinado por espectrometria de absorção atômica (AAS), em um espectrômetro Perkin Elmer 3030, com sistema de geração de hidretos Perkin Elmer MHS-10, utilizando-se a técnica de vaporização a frio.

2.2.2.5 - Determinação da atividade da ALA-D *in vivo*

Os animais foram anestesiados com éter e mortos por decapitação, 24 horas após a injeção de BAL. Cérebro, rim e fígado foram removidos, pesados, colocados no gelo e homogeneizados, respectivamente, em 5, 7 e 10 volumes de NaCl 150 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 4.000 g, a 4°C, por 10 min. O

sobrenadante obtido (S₁) foi utilizado nos ensaios para determinação da atividade da ALA-D.

A atividade da ALA-D foi determinada de acordo com o método de SASSA (1982), pela quantidade de produto (porfobilinogênio) formado. As condições ótimas para ensaio da atividade da ALA-D de camundongos (pH, concentração de substrato e tempo de incubação) foram previamente determinadas em nosso laboratório (PEREIRA et al., comunicação pessoal). O meio de incubação, cujo volume final era de 275 µl, continha 76 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,4), 2,2 mM de ALA e 100 µl da preparação tecidual. A quantidade de proteína incubada era de 0,4 - 0,5 mg de proteína para cérebro e 0,8 - 1,1 mg de proteína para rim e fígado. A reação era iniciada pela adição de 100 µl da preparação tecidual a um meio contendo o substrato. As amostras eram incubadas por 20 min a 2 horas, a 39°C. A reação era finalizada através da adição de 100 µl de TCA 10% contendo 0,05 M de HgCl₂. O produto da reação foi determinado com reagente de Ehrlich, a 555 nm, após 10 min. O coeficiente de absorção molar para o produto da reação do porfobilinogênio com o reagente de Ehrlich modificado é de $6,1 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

2.2.2.6 - Determinação de proteínas

A determinação do conteúdo protéico das amostras foi realizada de acordo com o método de BRADFORD (1976), utilizando-se albumina de soro bovino com padrão.

2.2.3 - Experimentos realizados *in vitro*

Todos os experimentos *in vitro* foram realizados utilizando-se camundongos adultos não intoxicados.

2.2.3.1 - Preparação tecidual

Os animais foram anestesiados com éter e mortos por decapitação. Cérebro, rim e fígado foram removidos, pesados, colocados no gelo e

homogeneizados, respectivamente, em 5, 7 e 10 volumes de NaCl 150 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 4.000 g, a 4°C, por 10 min. O sobrenadante obtido (S₁) foi utilizado nos ensaios para determinação da atividade da ALA-D e da velocidade de oxidação do BAL.

2.2.3.2 - Determinação da atividade da ALA-D *in vitro*

A atividade da ALA-D foi determinada conforme descrito no item 2.2.2.5. A quantidade de proteína incubada nos ensaios utilizando preparação tecidual S₁ era de 0,4 - 0,5 mg de proteína para cérebro e 0,8 - 1,1 mg de proteína para rim e fígado, enquanto que nos ensaios utilizando a ALA-D purificada, a quantidade foi de 0,2-0,3 mg para rim e 0,25-0,35 mg para fígado. Nos experimentos sem pré-incubação, a reação era iniciada pela adição de 100 µl da preparação tecidual a um meio contendo o substrato. Nos experimentos com 10 min de pré-incubação, a reação era iniciada 10 min após a adição da enzima (100 µl da preparação tecidual), adicionando-se o substrato.

2.2.3.3 - Efeito do 2,3-dimercaptopropanol e do HgCl₂ sobre a atividade da ALA-D *in vitro*

O efeito do BAL e do HgCl₂ sobre a atividade da ALA-D cerebral, renal e hepática, *in vitro*, foi determinado com e sem 10 min de pré-incubação, utilizando-se camundongos adultos não intoxicados. Nos experimentos sem pré-incubação, a reação era iniciada com a adição de 100 µl de preparação tecidual a um meio contendo dimercaprol, cloreto de mercúrio, tampão e substrato. Nos experimentos com 10 min de pré-incubação, a enzima (100 µl de preparação tecidual) era colocada em contato com o cloreto de mercúrio e/ou BAL, na presença de tampão, por 10 min, após decorrido este período de tempo iniciava-se a reação adicionando-se o substrato. O IC₅₀ do HgCl₂ para inibição da ALA-D na presença de BAL, foi calculado pelo método de DIXON & WEBB (1964).

2.2.3.4 - Determinação da concentração de zinco livre

As medidas foram realizadas por polarografia de pulso diferencial em um polarógrafo Metrohm 646, com amostrador automático 675. Utilizou-se como eletrodo de referência Ag/AgCl 3M, e platina como contra eletrodo. As medidas foram realizadas com eletrodo no modo DME, utilizando-se os seguintes parâmetros:

amplitude de pulso	-50 mV
tempo de gota	600 ms
varredura de potencial	-400 à -1.200 mV
velocidade de varredura	10,0 mV/s

Foi utilizado tampão fosfato de potássio 76 mM, pH 6,4 como eletrólito suporte. Cada célula foi desaerada por 10 min com nitrogênio superseco, antes das análises polarográficas. A determinação polarográfica se baseou no fato do zinco ser ativo em solução aquosa em -1.100 mV (versus Ag/AgCl). A concentração de metal foi determinada por comparação com uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de zinco.

2.2.3.5 - Determinação da taxa de oxidação do 2,3-dimercaptopropanol

A taxa de oxidação do BAL foi determinada nas mesmas condições utilizadas no ensaio para ALA-D (pH, temperatura, tempo de incubação). Experimentos prévios realizados em nosso laboratório (dados não mostrados) demonstraram que o ALA (2,2 mM) não alterou a taxa de oxidação do BAL em presença ou em ausência de preparações teciduais. Por isto o substrato não foi utilizado nos experimentos de determinação da velocidade de oxidação do BAL. A taxa de oxidação do BAL (500 μ M) foi avaliada através da medida do desaparecimento dos seus grupos -SH. A determinação da concentração de grupos -SH livres foi realizada de acordo com o método de ELLMAN (1959). A incubação foi iniciada pela adição de 200 μ l de preparação tecidual (S_1) (volume final 550 μ l), imediatamente após a adição do BAL. Alíquotas de 100 μ l foram removidas 0, 10, 30 e 60 min após o início da incubação, para determinação do conteúdo de -SH. As alíquotas foram misturadas com 2 ml de água e 25 μ l de DTNB 10 mM. O DTNB foi

preparado em tampão fosfato de potássio 0,5 M, pH 7,0, contendo 15 mg de NaHCO_3 para cada 40 mg de DTNB. A leitura da densidade ótica foi realizada em 412 nm (coeficiente de extinção molar $1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A concentração de grupos -SH do BAL na presença de sobrenadantes teciduais (S_1) foi obtida pela diferença entre a concentração de grupos -SH no tubo BAL + tecido e a concentração de -SH no tubo contendo somente a preparação tecidual.

2.2.3.6 - Purificação parcial da ALA-D

Rim e fígado foram homogeneizados, respectivamente, em 6,5 e 2,5 volumes de um meio contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,4), 3 mM de DTT e 30 μM de ZnCl_2 . Os homogeneizados foram centrifugados a 4.000 g, a 4°C, por 15 min. A fração sobrenadante obtida (S_1) foi aquecida a 60°C, em um Erlenmeyer de 250 ml, em banho-térmico. A temperatura (60°C) foi mantida por 15 minutos. Após este período de tempo, o frasco foi rapidamente resfriado e a proteína desnaturada foi removida por centrifugação a 4.000 g, a 4°C, por 15 min. A fração sobrenadante (S_2) foi tratada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (35% de saturação para fígado e 30% para rim). O precipitado foi removido por centrifugação a 4.000 g, a 4°C, por 20 min. A fração sobrenadante obtida (S_3) foi novamente tratada com sulfato de amônia (55% de saturação, para ambos os tecidos), e o precipitado foi coletado por centrifugação à 4000g, a 4°C, por 20 min. O precipitado ($P_{55\%}$), o qual continha a enzima, foi ressuspenso em um meio contendo tampão fosfato de potássio 20 mM (pH 6,4), DTT 1 mM e ZnCl_2 10 μM . Este procedimento permitiu uma purificação de 4-8 vezes para a enzima renal e de 15-30 vezes para a enzima hepática, em relação à atividade da ALA-D nos respectivos homogeneizados. A enzima parcialmente purificada foi armazenada a -20°C.

2.2.3.7 - Reativação da ALA-D parcialmente purificada

Em alguns experimentos, antes de utilizada, a ALA-D parcialmente purificada foi reativada por incubação com 10 mM de DTT e 20 μM de ZnCl_2 , a 45°C, por 15 min. Imediatamente antes de começar a reação, a enzima foi diluída para

que as concentrações de DTT e $ZnCl_2$ no meio de incubação fossem de 100 e 0,2 μM , respectivamente.

2.2.3.8 - Determinação de proteínas

A determinação do conteúdo protéico das amostras foi realizada conforme descrito no item 2.2.2.6.

2.2.4 - Análise estatística

O peso corporal em função dos dias de tratamento foi analisado por ANOVA de 3 vias (3 Hg x 2 BAL x 5 dias), com o fator dia tratado como medida repetida. Os dados de atividade da ALA-D, *in vitro*, na presença de $HgCl_2$ e BAL foram analisados por ANOVA de 3 vias (3 Hg x 2 BAL x 2 pré-incubação), seguido do teste de Duncan. Os resultados dos experimentos de determinação da velocidade de oxidação do BAL, e do efeito da superóxido dismutase, NADH e manitol na atividade da ALA-D foram analisados por ANOVA de 1 via. Os demais resultados foram analisados por ANOVA de 2 vias, seguida do teste de Duncan, quando apropriado. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

3.0 - RESULTADOS

3.1 - Intoxicação com cloreto de mercúrio e tratamento com BAL

3.1.1 - Peso corporal e peso dos órgãos dos animais tratados

O peso corporal dos animais não foi alterado pelo tratamento com HgCl_2 e BAL (Tabela 1). O tratamento com cloreto de mercúrio e BAL também não alterou o peso de órgão, nem a razão peso do órgão/peso corporal, de fígado e cérebro (Tabela 2). Os animais intoxicados com 4,6 mg/kg de HgCl_2 , independente do tratamento com BAL apresentaram um aumento significativo no peso renal e na razão peso renal/peso corporal (Tabela 2). A análise do peso seco renal revelou que o aumento no peso renal dos animais tratados com 4,6 mg/kg de HgCl_2 não foi devido a um aumento no conteúdo de água deste órgão (Tabela 3).

3.1.2 - Atividade da delta-aminolevulinato desidratase

A Tabela 4 mostra o efeito do tratamento com cloreto de mercúrio e BAL sobre a atividade da ALA-D. A enzima cerebral, independente do tratamento com BAL, não foi inibida pelo cloreto de mercúrio. Após a administração de 2,3 e 4,6 mg/kg de HgCl_2 os animais apresentaram uma inibição de 33 e 40%, respectivamente, na atividade da ALA-D renal. O BAL *per se* causou uma inibição de 18% na atividade da ALA-D renal. O tratamento com BAL não foi capaz de reverter a inibição causada por 2,3 mg/kg de HgCl_2 na atividade da enzima renal e potencializou a inibição causada por 4,6 mg/kg de HgCl_2 . A enzima hepática apresentou uma inibição de 25% após a administração de 4,6 mg/kg de HgCl_2 e o BAL não reverteu essa inibição.

3.1.3 - Uréia sérica

A Tabela 5 mostra o efeito do HgCl_2 e do tratamento com BAL na concentração de uréia sérica. A administração de 4,6 mg/kg de HgCl_2 , independente do tratamento com BAL, aumentou significativamente a concentração de uréia no soro dos camundongos.

TABELA 1- Peso corporal de camundongos adultos tratados por 3 dias com cloreto de mercúrio e por 1 dia com BAL 0,25 mmol/kg (*sc*).

TRATAMENTO	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
0 mg/kg Hg + veículo	35,2 ± 1,3	35,2 ± 1,4	35,2 ± 1,4	35,2 ± 1,3	35,8 ± 1,4
0 mg/kg Hg + BAL	36,1 ± 0,9	36,3 ± 1,0	36,3 ± 1,0	36,6 ± 1,0	37,3 ± 1,0
2,3 mg/kg Hg + veículo	36,7 ± 0,7	36,2 ± 0,8	36,0 ± 0,7	36,2 ± 0,8	36,7 ± 0,7
2,3 mg/kg Hg + BAL	35,3 ± 1,2	34,9 ± 1,1	34,5 ± 1,1	35,1 ± 1,1	35,0 ± 1,1
4,6 mg/kg Hg + veículo	34,9 ± 0,9	34,4 ± 1,0	33,3 ± 0,9	32,8 ± 1,0	32,5 ± 1,1
4,6 mg/kg Hg + BAL	38,4 ± 0,8	37,6 ± 0,9	36,5 ± 0,8	35,3 ± 0,8	34,2 ± 1,0

Os camundongos foram tratados conforme descrito em material e métodos, item 2.2.2.1. Os dados são apresentados como média ± E.P. (n= 16-21). ANOVA de 3 vias (3 Hg x 2 BAL x 5 dias), com o dia tratado como medida repetida, não revelou efeito significativo do tratamento.

UFRGS
BIBLIOTECA SETORIAL 09
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

TABELA 2 - Peso do órgão e razão peso do órgão/peso corporal de camundongos adultos tratados 3 dias com cloreto de mercúrio, e 1 dia com BAL 0,25 mmol/kg (sc).

	<u>cérebro</u> (mg)	<u>peso cerebral/peso</u> <u>corporal</u> (mg/g)	<u>n</u>
0 mg/kg Hg + veículo	487,72 ± 8,37	13,94 ± 0,49	21
0 mg/kg Hg + BAL	485,40 ± 7,78	13,12 ± 0,29	21
2,3 mg/kg Hg + veículo	491,40 ± 7,94	13,47 ± 0,30	21
2,3 mg/kg Hg + BAL	472,27 ± 6,41	13,46 ± 0,39	21
4,6 mg/kg Hg + veículo	481,84 ± 8,15	15,42 ± 0,49	17
4,6 mg/kg Hg + BAL	487,53 ± 8,19	14,42 ± 0,56	15
	<u>rim</u> (mg)	<u>peso renal/peso</u> <u>corporal</u> (mg/g)	<u>n</u>
0 mg/kg Hg + veículo	490,46 ± 29,3	13,62 ± 0,40	16
0 mg/kg Hg + BAL	486,92 ± 22,0	13,00 ± 0,65	16
2,3 mg/kg Hg + veículo	583,41 ± 23,6	15,63 ± 0,62	16
2,3 mg/kg Hg + BAL	544,61 ± 23,2	14,87 ± 0,68	15
4,6 mg/kg Hg + veículo	622,04 ± 35,5 *	19,68 ± 1,12 *	13
4,6 mg/kg Hg + BAL	625,54 ± 63,0 *	20,84 ± 1,46 *	11
	<u>figado</u> (mg)	<u>peso hepático/peso</u> <u>corporal</u> (mg/g)	<u>n</u>
0 mg/kg Hg + veículo	1855,19 ± 89,2	51,98 ± 1,41	16
0 mg/kg Hg + BAL	1979,19 ± 68,8	52,38 ± 1,36	16
2,3 mg/kg Hg + veículo	2020,31 ± 67,1	54,44 ± 1,70	16
2,3 mg/kg Hg + BAL	1765,25 ± 68,0	49,32 ± 2,06	16
4,6 mg/kg Hg + veículo	1799,62 ± 94,2	56,12 ± 1,80	13
4,6 mg/kg Hg + BAL	1854,91 ± 81,2	54,05 ± 1,97	11

Os camundongos foram tratados conforme indicado na tabela 1. Os dados são apresentados como média ± E.P. ANOVA de 2 vias revelou um efeito significativo do HgCl₂ no peso renal (F(2,81)=8,55, p<0,01) e na razão peso do rim/peso corporal (F(2,81)=35,72, p<0,01). * Significativamente diferentes do grupo 0 mg/kg Hg + veículo (p<0,05, pelo teste do raio múltiplo de Duncan).

TABELA 3 - Efeito de 3 doses de HgCl_2 e uma dose de BAL 0,25 mmol/kg sobre o peso seco renal de camundongos adultos.

	Peso seco (%)
0 mg/kg HgCl_2 + veículo	25,79 \pm 0,9
0 mg/kg HgCl_2 + BAL	26,25 \pm 1,0
2,3 mg/kg HgCl_2 + veículo	28,57 \pm 0,8
2,3 mg/kg HgCl_2 + BAL	26,79 \pm 0,7
4,6 mg/kg HgCl_2 + veículo	25,01 \pm 0,9
4,6 mg/kg HgCl_2 + BAL	23,83 \pm 0,8

Os camundongos foram tratados conforme indicado na tabela 1. Os dados são apresentados como média da percentagem de peso seco em relação ao peso úmido do órgão \pm E.P. (n=5). ANOVA de 2 vias (3 Hg x 2 BAL) não revelou efeito significativo do tratamento.

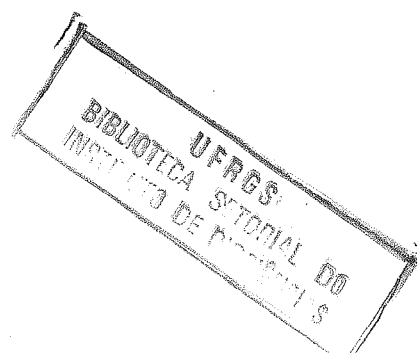


TABELA 4 - Atividade da ALA-D cerebral, renal e hepática de camundongos adultos expostos a cloreto de mercúrio e tratados com BAL 0.25 mmol/kg (sc).

CÉREBRO		
		<u>n</u>
0 mg/kg Hg + veículo	39,92 ± 1,69	10
0 mg/kg Hg + BAL	36,52 ± 2,29	15
2,3 mg/kg Hg + veículo	34,06 ± 2,35	15
2,3 mg/kg Hg + BAL	35,97 ± 2,92	14
4,6 mg/kg Hg + veículo	31,77 ± 1,99	10
4,6 mg/kg Hg + BAL	33,61 ± 3,10	09
RIM		
		<u>n</u>
0 mg/kg Hg + veículo	77,68 ± 7,69	11
0 mg/kg Hg + BAL	63,34 ± 3,27	09 *
2,3 mg/kg Hg + veículo	52,14 ± 5,48	09 *
2,3 mg/kg Hg + BAL	58,49 ± 4,13	08 *
4,6 mg/kg Hg + veículo	46,48 ± 4,57	07 *
4,6 mg/kg Hg + BAL	29,27 ± 2,86	06 ^a
FÍGADO		
		<u>n</u>
0 mg/kg Hg + veículo	252,84 ± 9,17	11
0 mg/kg Hg + BAL	211,64 ± 18,21	09
2,3 mg/kg Hg + veículo	227,15 ± 29,96	09
2,3 mg/kg Hg + BAL	210,09 ± 13,61	09
4,6 mg/kg Hg + veículo	191,85 ± 16,98	07 *
4,6 mg/kg Hg + BAL	165,15 ± 15,30	07 *

Os animais foram tratados conforme indicado na tabela 1. A atividade é expressa como nmol of porfobilinogênio formado/h/mg de proteína. Os dados são apresentados como média ± E.P. O número de animais utilizados está indicado entre parênteses. ANOVA de 2 vias revelou um efeito significativo do HgCl₂ (F(2,46)= 5,86, p<0,01) na ALA-D hepática e um efeito significativo do HgCl₂ (F(2,44)= 37,20, p<0,01), do BAL (F(1,44)= 7,02, p<0,01) e uma interação HgCl₂ x BAL (F(2,44)=5,91,p<0,01) na enzima renal. * Significativamente diferentes do grupo 0 mg/kg Hg + veículo (p<0,01). ^a Significativamente diferente do grupo 4,6 mg/kg Hg + veículo (p<0,01).

TABELA 5 - Efeito de 3 doses de HgCl_2 e uma dose de BAL 0,25 mmol/kg sobre a concentração de uréia sérica de camundongos adultos.

	CONCENTRAÇÃO DE URÉIA (mg/dl soro)
0 mg/kg Hg + veículo	66,96 \pm 5,37
0 mg/kg Hg + BAL	60,68 \pm 4,13
2,3 mg/kg Hg + veículo	59,54 \pm 6,36
2,3 mg/kg Hg + BAL	52,86 \pm 3,51
4,6 mg/kg Hg + veículo	120,17 \pm 15,32*
4,6 mg/kg Hg + BAL	106,31 \pm 24,62*

Os animais foram tratados conforme indicado na tabela 1. Os dados são apresentados como média \pm E.P. (n=6-10). * Significativamente diferentes do grupo 0 mg/kg Hg + veículo ($p < 0,01$).

3.1.4 - Dosagem do mercúrio tecidual

A figura 5 mostra o conteúdo de mercúrio no cérebro, rim e fígado dos camundongos injetados com 0, 2,3 ou 4,6 mg/kg de HgCl₂ e 0 ou 0,25 mmol/kg de BAL. Após 3 doses de HgCl₂ 2,3 mg/kg, o conteúdo de mercúrio renal aumentou e o tratamento com BAL foi incapaz de remover o mercúrio deste órgão. Após 3 doses de HgCl₂ 4,6 mg/kg, aumentou a deposição do metal no fígado. O tratamento com BAL, após administração de 4,6 mg/kg de HgCl₂, promoveu um aumento no conteúdo de mercúrio cerebral e hepático.

3.2 - Efeito do BAL e do HgCl₂ sobre a atividade da ALA-D *in vitro*

Devido ao inesperado efeito inibitório do BAL sobre a atividade da ALA-D renal, *in vivo* (Tabela 4), decidiu-se investigar um possível efeito inibitório do BAL, bem como o efeito combinado do BAL e do HgCl₂ sobre a atividade da ALA-D, *in vitro*.

Sem pré-incubação e na ausência de HgCl₂, o BAL não produziu efeito estatisticamente significativo na atividade da ALA-D em todos os tecidos (Figuras 6A, 7A e 8A).

3.2.1- Cérebro

Sem pré-incubação, o HgCl₂ causou uma inibição dose-dependente na atividade da ALA-D cerebral (Figure 6A). A redução do IC₅₀ do cloreto de mercúrio para inibição da ALA-D cerebral, na presença de BAL, indica que o BAL aumentou a potência inibitória do mercúrio (Tabela 6).

O HgCl₂, após 10 min de pré-incubação com a ALA-D cerebral, provocou uma inibição dose-dependente da enzima (Figura 6B). A potência inibitória do HgCl₂ foi maior quando o metal era pré-incubado com a enzima durante 10min, comparado com o ensaio sem pré-incubação (Tabela 6, figuras 6A e 6B). A enzima cerebral não foi inibida, mas sim ativada, quando pré-incubada durante 10 min com 500 µM deste composto. Nos ensaios com 10 min de pré-incubação, a presença de 100 e

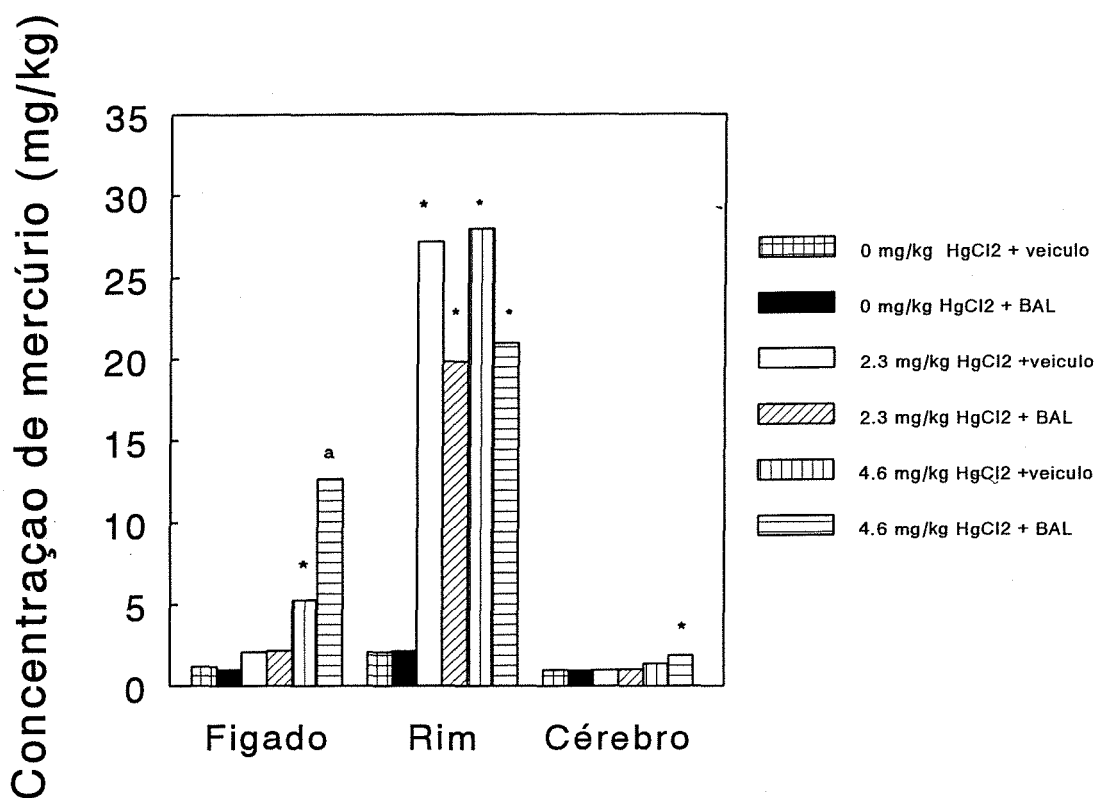


FIGURA 5 - Conteúdo de mercúrio cerebral, renal e hepático de camundongos injetados com 3 doses de HgCl₂ 0, 2,3 ou 4,6 mg/kg e uma dose de BAL 0 ou 0,25 mmol/kg. Os animais foram tratados conforme indicado na tabela 1. Os dados são apresentados como média \pm E.P. (n=5-8). * Significativamente diferente do grupo 0 mg/kg HgCl₂ + veículo. ^a Significativamente diferente dos grupos 0 mg/kg HgCl₂ + veículo e 4,6 mg/kg HgCl₂ + veículo.

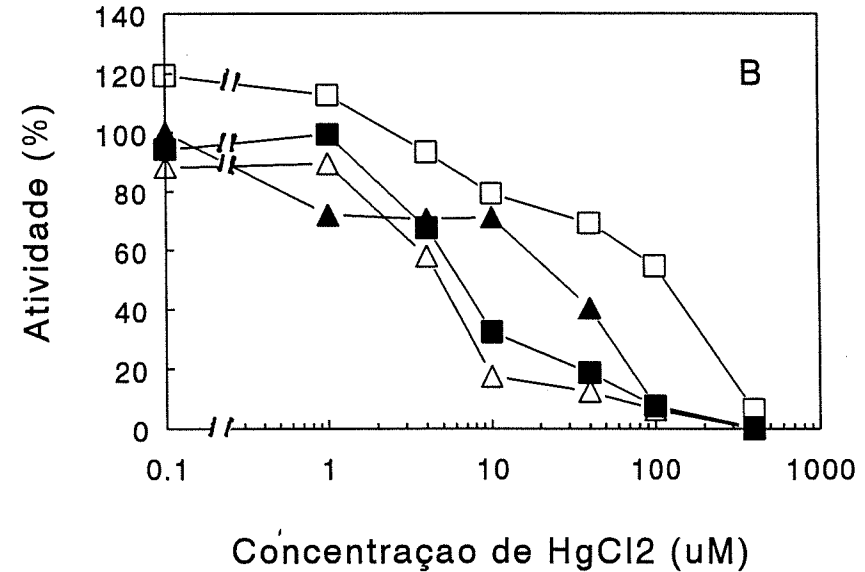
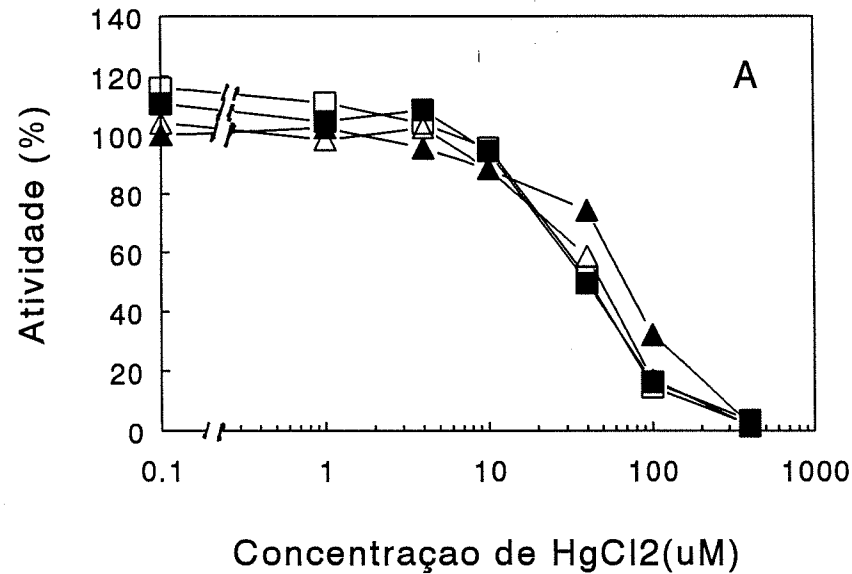


FIGURA 6 - Efeito do BAL (0, 100, 250 e 500 μM) e do HgCl_2 (0, 1, 4, 10, 40, 100 e 400 μM) sobre a atividade da ALA-D cerebral, sem pré-incubação (A) e com 10 min de pré-incubação (B). Nos experimentos com pré-incubação a ALA-D cerebral foi pré-incubada com BAL e/ou HgCl_2 (adicionados simultaneamente), durante 10 min, antes do início da reação enzimática. A reação era iniciada pela adição do substrato. Nos experimentos sem pré-incubação a reação era iniciada pela adição da preparação tecidual (enzima) a um meio contendo dimercaprol e/ou HgCl_2 e substrato. A atividade da ALA-D é expressa como porcentagem em relação à atividade do grupo controle (0 μM BAL + 0 μM HgCl_2) (n= 5). As atividades dos controles nos experimentos sem e com pré-incubação foram, respectivamente, de 198,14 e 147,48 nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína. O erro padrão foi menor que 15% das respectivas médias. -▲- 0 μM de BAL, -△- 100 μM de BAL, -■- 250 μM de BAL e -□- 500 μM de BAL.

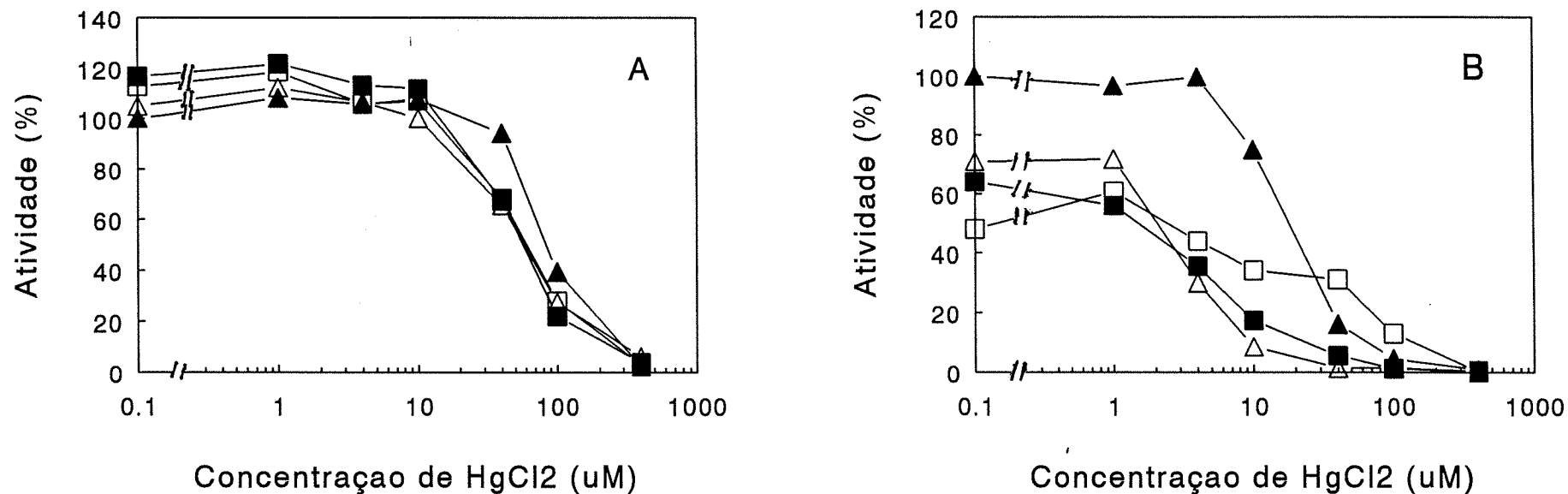


FIGURA 7 - Efeito do BAL (0, 100, 250 e 500 μM) e do HgCl_2 (0, 1, 4, 10, 40, 100 e 400 μM) sobre a atividade da ALA-D renal, *in vitro*, sem pré-incubação (A) e com 10 min de pré-incubação (B). Nos experimentos com pré-incubação a ALA-D renal foi pré-incubada com BAL e/ou HgCl_2 (adicionados simultaneamente), durante 10 min, antes do início da reação enzimática. A reação era iniciada pela adição do substrato. Nos experimentos sem pré-incubação a reação era iniciada pela adição da preparação tecidual (enzima) a um meio contendo dimercaprol e/ou HgCl_2 e substrato. A atividade da ALA-D é expressa como porcentagem em relação à atividade do grupo controle (0 μM BAL + 0 μM HgCl_2) (n= 5). As atividades dos controles nos experimentos sem e com pré-incubação foram, respectivamente, de 91,88 e 81,50 nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína. O erro padrão foi menor que 15% das respectivas médias. -▲- 0 μM de BAL, -△- 100 μM de BAL, -■- 250 μM de BAL e -□- 500 μM de BAL.

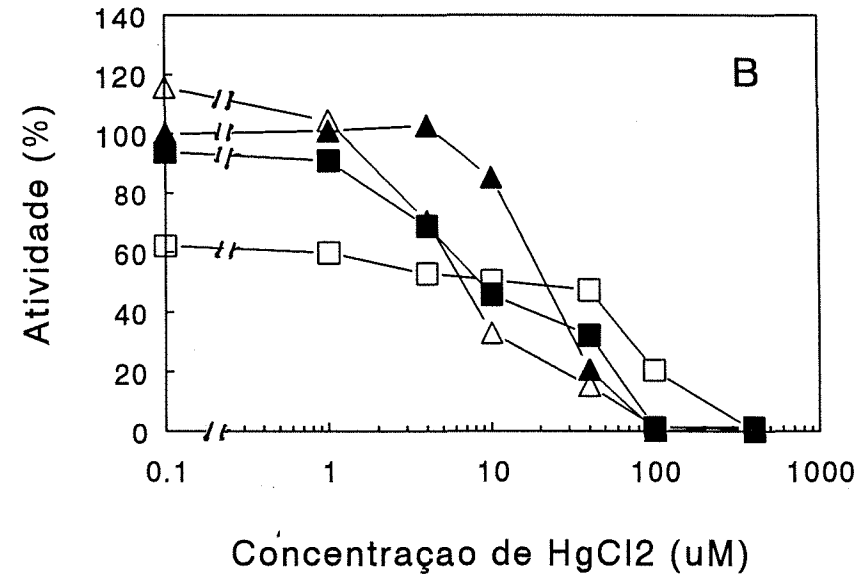
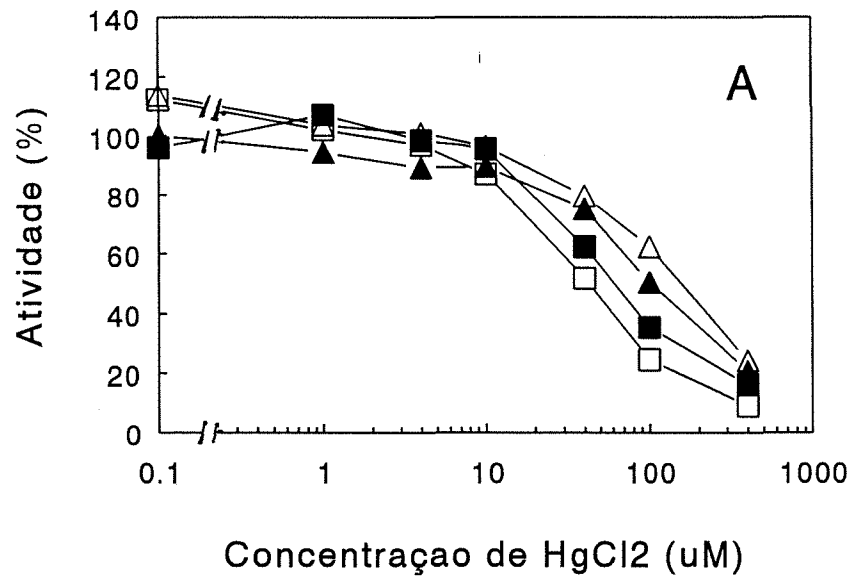


FIGURA 8 - Efeito do BAL (0, 100, 250 e 500 μM) e do HgCl_2 (0, 1, 4, 10, 40, 100 e 400 μM) sobre a atividade da ALA-D hepática, *in vitro*, sem pré-incubação (A) e com 10 min de pré-incubação (B). Nos experimentos com pré-incubação a ALA-D hepática foi pré-incubada com BAL e/ou HgCl_2 (adicionados simultaneamente), durante 10 min, antes do início da reação enzimática. A reação era iniciada pela adição do substrato. Nos experimentos sem pré-incubação a reação era iniciada pela adição da preparação tecidual (enzima) a um meio contendo dimercaprol e/ou HgCl_2 e substrato. A atividade da ALA-D é expressa como porcentagem em relação à atividade do grupo controle (0 μM BAL + 0 μM HgCl_2) (n= 5). As atividades dos controles nos experimentos sem e com pré-incubação foram, respectivamente, de 46,31 e 37,11 nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína. O erro padrão foi menor que 15% das respectivas médias. -▲- 0 μM de BAL, -△- 100 μM de BAL, -■- 250 μM de BAL e -□- 500 μM de BAL.

TABELA 6 - IC₅₀ para inibição da ALA-D cerebral, renal e hepática por cloreto de mercúrio, na presença de concentrações crescentes de BAL, *in vitro*.

	BAL (μM)	Cérebro	Rim	Fígado
	0	85,57 ± 18,72	92,14 ± 11,28	101,64 ± 11,54
sem pré-	100	55,85 ± 12,74	72,03 ± 23,00	119,57 ± 11,36
incubação	250	45,45 ± 13,04	60,30 ± 8,84	60,77 ± 11,94*
	500	39,39 ± 11,32*	41,91 ± 8,58*	38,26 ± 6,39*
	0	29,95 ± 8,36	20,37 ± 1,92	23,46 ± 4,41
com pré-	100	4,19 ± 0,90*	3,09 ± 0,47*	4,01 ± 0,98*
incubação	250	6,02 ± 0,93*	5,09 ± 2,21*	12,31 ± 2,59*
	500	93,96 ± 15,01*	66,54 ± 14,58*	72,78 ± 9,43*

Dados expressos como μM ± E.P. (n=5 para todos os grupos) de metal necessário para causar 50% de inibição na enzima.

* Indica efeito significativo do BAL (p<0,05).

250 μM de BAL reduziu o IC_{50} do HgCl_2 para inibição da ALA-D, enquanto que 500 μM de BAL aumentou este valor (Tabela 6).

3.2.2 - Rim

Sem pré-incubação, o HgCl_2 causou uma inibição dose dependente da ALA-D renal (Figura 7A). O decréscimo no valor do IC_{50} do HgCl_2 para inibição da ALA-D renal na presença de BAL indica que este composto aumentou a potência inibitória do mercúrio (Tabela 6).

Com pré-incubação, a ALA-D renal foi inibida de modo dose-dependente pelo mercúrio e a potência inibitória do mercúrio foi aumentada significativamente, quando comparada aos experimentos sem pré-incubação (Figura 7A, 7B e Tabela 6). Assim como foi observado para cérebro, o BAL nas concentrações de 100 e 250 μM aumentou a potência inibitória do mercúrio (Tabela 6 e Figura 7B), enquanto que na concentração de 500 μM provocou uma redução nesta potência (Tabela 6).

Após 10 min de pré-incubação, a atividade da ALA-D renal foi significativamente inibida por 250 e 500 μM de BAL (Figura 7B).

3.2.3 - Fígado

Sem pré-incubação o HgCl_2 causou uma inibição dose dependente na atividade da ALA-D hepática (Figura 8A). O decréscimo no valor do IC_{50} do cloreto de mercúrio para inibição da ALA-D hepática, em presença de BAL, indica que o BAL aumentou a potência inibitória do mercúrio, do mesmo modo que o observado para as enzimas de cérebro e de rim (Figura 8A e Tabela 6).

Após 10 min de pré-incubação, o HgCl_2 causou uma inibição dose dependente da ALA-D hepática. Com pré-incubação, a potência inibitória do mercúrio foi maior do que a observada sem pré-incubação (Tabela 6). Assim como foi observado para as enzimas cerebral e renal, o BAL (100 e 250 μM) aumentou a potência inibitória do mercúrio para a ALA-D hepática (Tabela 6). No entanto, 500 μM de BAL causou uma redução na potência inibitória do HgCl_2 (Tabela 6).

Com 10 min de pré-incubação, apenas 500 μM de BAL causou uma inibição significativa da ALA-D hepática (Figura 8B).

3.3 - Mecanismo de inibição da ALA-D pelo BAL

3.3.1 - Papel do zinco na inibição da ALA-D pelo BAL

Para verificar se o BAL inibe a ALA-D através da quelação de íons zinco essenciais, investigou-se o efeito concomitante do ZnCl_2 e do BAL sobre a atividade da ALA-D (Figuras 9A, B e C). O BAL (100 a 500 μM) e o ZnCl_2 (25 μM) aumentaram significativamente a atividade da enzima cerebral (Figura 9A). A enzima renal foi significativamente inibida por BAL nas concentrações de 250 a 500 μM . Por outro lado, a presença de 5 μM de ZnCl_2 ativou significativamente a ALA-D renal. A presença de 25 a 100 μM de ZnCl_2 preveniu a inibição da ALA-D renal pelo BAL ($p < 0,05$). Na verdade, 50 e 100 μM de ZnCl_2 restauraram a atividade da ALA-D renal significativamente acima da atividade obtida no tubo controle (Figura 9B). A ALA-D hepática, assim como a enzima renal, também foi inibida por BAL nas concentrações de 250 a 500 μM ($p < 0,05$). A enzima hepática foi inibida por 100 μM de ZnCl_2 ($p < 0,05$). O ZnCl_2 na concentração de 5 μM , não foi capaz de reativar a ALA-D hepática inibida por BAL, enquanto que 25 a 100 μM de ZnCl_2 recuperaram completamente a atividade da enzima (Figura 9C).

A figura 10A mostra a concentração de zinco livre determinada polarograficamente, na presença de 500 μM de BAL, após sucessivas adições de ZnCl_2 . Os resultados apresentados na figura 10A demonstram que o BAL realmente quelou zinco nas condições usadas nos nossos ensaios enzimáticos (76 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6,4), uma vez que a concentração de zinco livre na presença de 500 μM de BAL foi sempre menor que a quantidade de zinco adicionada. A quantidade de zinco quelada pelo BAL reduzido (500 μM) é maior que a quelada pela mesma concentração de cisteína (Figura 10A). Experimentos realizados anteriormente em nosso laboratório demonstram que até 5 mM, este monotiol não provoca inibição na atividade da ALA-D renal, nem hepática em camundongos (Rocha et al., comunicação pessoal). Além disso, após a adição de zinco em baixas concentrações (até 20 μM), a quantidade de zinco quelada por 500 μM de BAL reduzido foi semelhante a quelada por 20 μM de EDTA

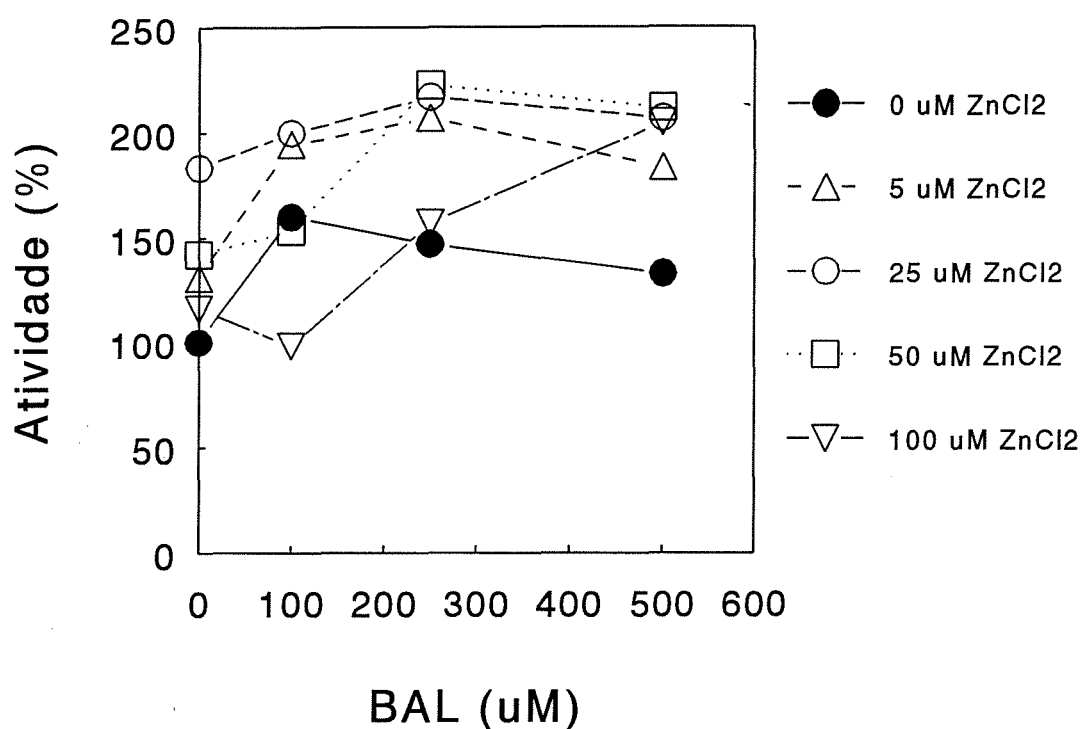


FIGURA 9A - Efeito do BAL (0, 100, 250 e 500 μM) e do ZnCl_2 (0, 5, 25, 50 e 100 μM) sobre a atividade da ALA-D cerebral, *in vitro*, com 10 min de pré-incubação. A ALA-D cerebral foi pré-incubada com BAL e/ou ZnCl_2 (adicionados simultaneamente), durante 10 min, antes do início da reação enzimática. A reação era iniciada pela adição do substrato. A atividade da ALA-D é expressa como porcentagem em relação à atividade do grupo controle (0 μM BAL + 0 μM ZnCl_2) (n=5). A atividade do grupo controle corresponde a 31,56 nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína. O erro padrão foi menor que 15% das respectivas médias.

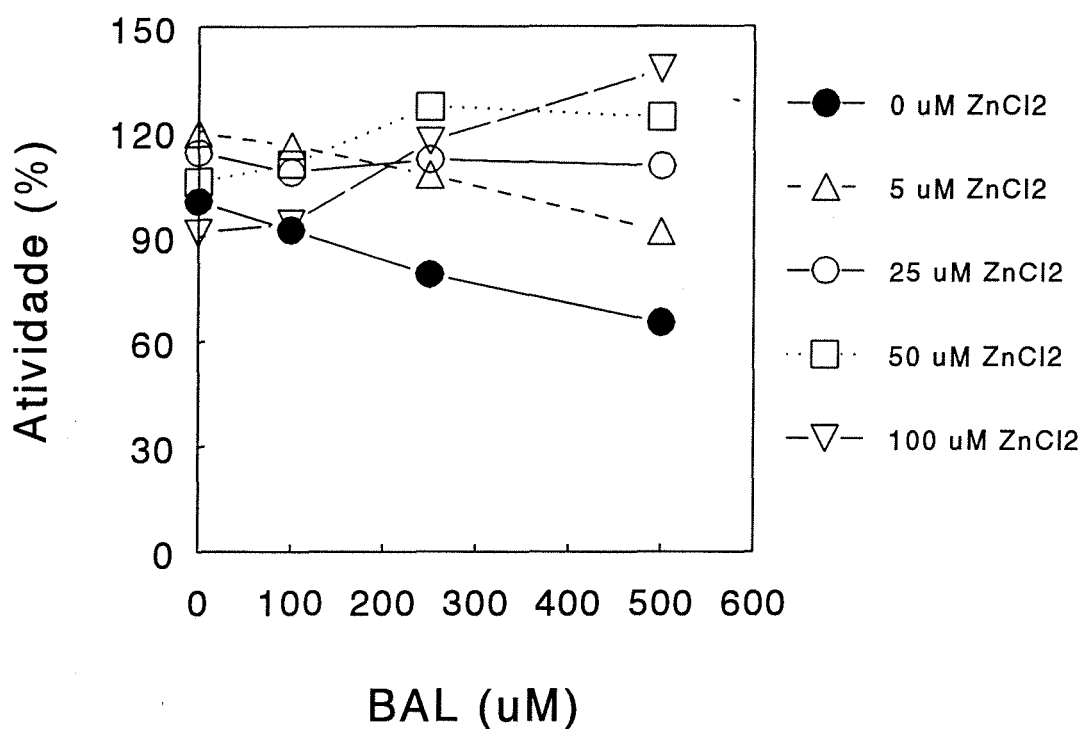


FIGURA 9B - Efeito do BAL (0, 100, 250 e 500 μM) e do ZnCl_2 (0, 5, 25, 50 e 100 μM) sobre a atividade da ALA-D renal, *in vitro*, com 10 min de pré-incubação. A ALA-D renal foi pré-incubada com BAL e/ou ZnCl_2 (adicionados simultaneamente), durante 10 min, antes do início da reação enzimática. A reação era iniciada pela adição do substrato. A atividade da ALA-D é expressa como porcentagem em relação à atividade do grupo controle (0 μM BAL + 0 μM ZnCl_2) (n=5). A atividade do grupo controle corresponde a 69,8 nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína. O erro padrão foi menor que 15% das respectivas médias.

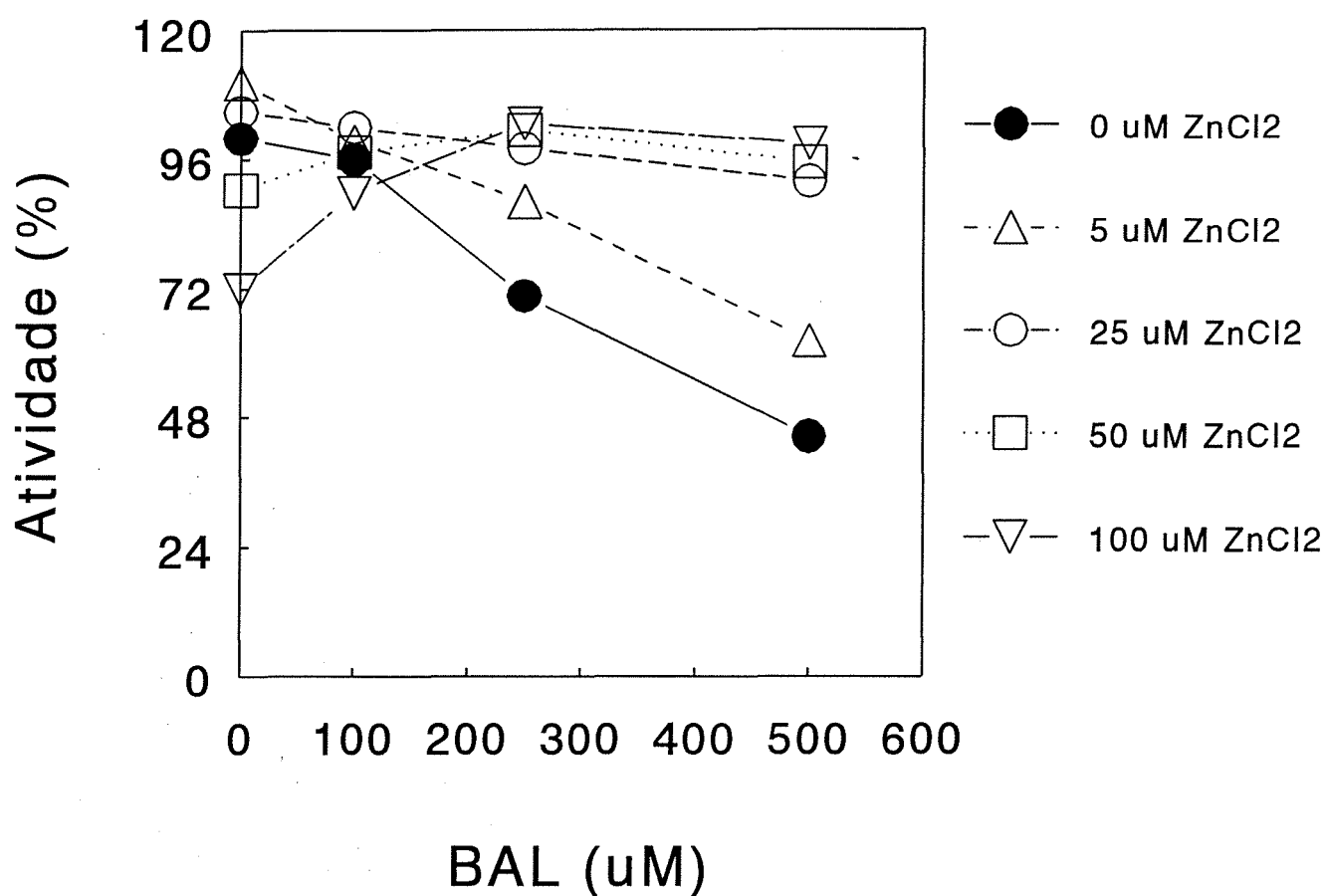


FIGURA 9C - Efeito do BAL (0, 100, 250 e 500 μM) e do ZnCl_2 (0, 5, 25, 50 e 100 μM) sobre a atividade da ALA-D hepática, *in vitro*, com 10 min de pré-incubação. A ALA-D hepática foi pré-incubada com BAL e/ou ZnCl_2 (adicionados simultaneamente), durante 10 min, antes do início da reação enzimática. A reação era iniciada pela adição do substrato. A atividade da ALA-D é expressa como porcentagem em relação à atividade do grupo controle (0 μM BAL + 0 μM ZnCl_2) ($n=5$). A atividade do grupo controle corresponde a 231,24 nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína. O erro padrão foi menor que 15% das respectivas médias.

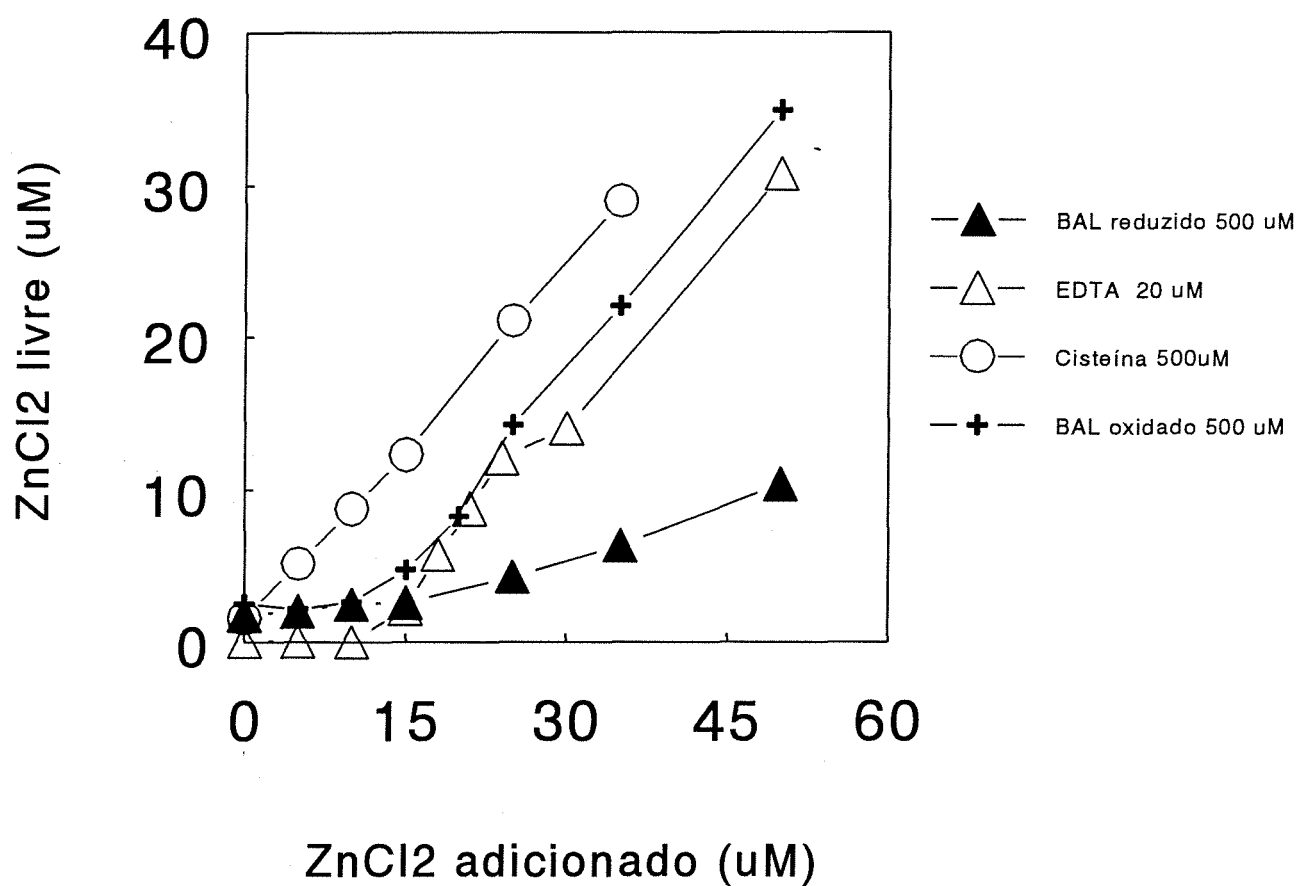


FIGURA 10A - Concentração de zinco livre em uma solução de tampão fosfato de potássio 76 mM, pH 6,4, na presença de 500 μ M de BAL reduzido, 20 μ M de EDTA, 500 μ M de cisteína ou 500 μ M de BAL oxidado após sucessivas adições de ZnCl₂. Os dados apresentados nesta figura correspondem a um experimento representativo.

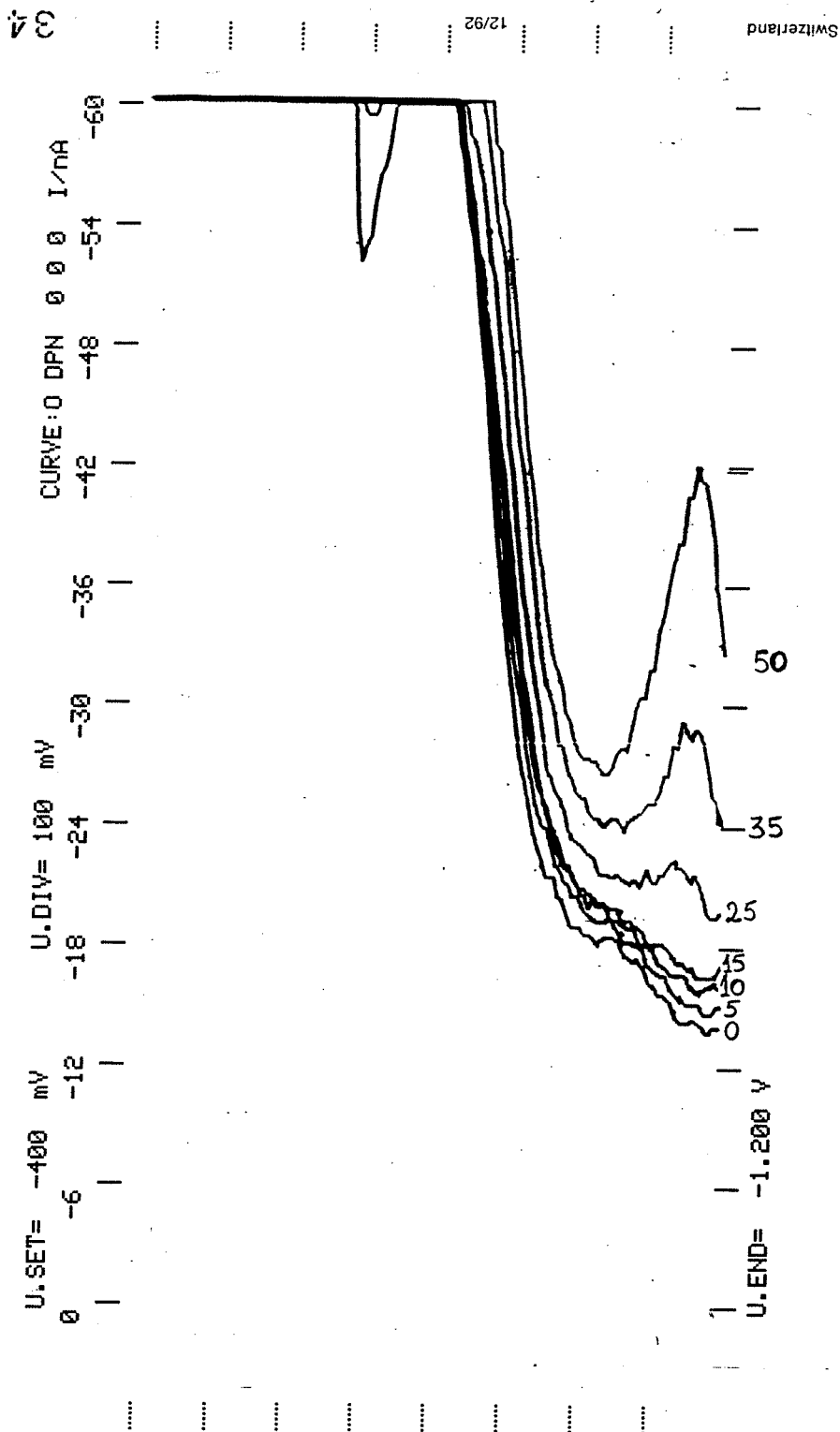


FIGURA 10B - Polarogramas obtidos com sucessivas adições de ZnCl_2 a uma solução contendo $500 \mu\text{M}$ de BAL reduzido e 76 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6,4. As concentrações de zinco (μM) adicionados para obtenção de cada polarograma estão indicadas na figura. Os dados apresentados nesta figura correspondem a um experimento representativo.

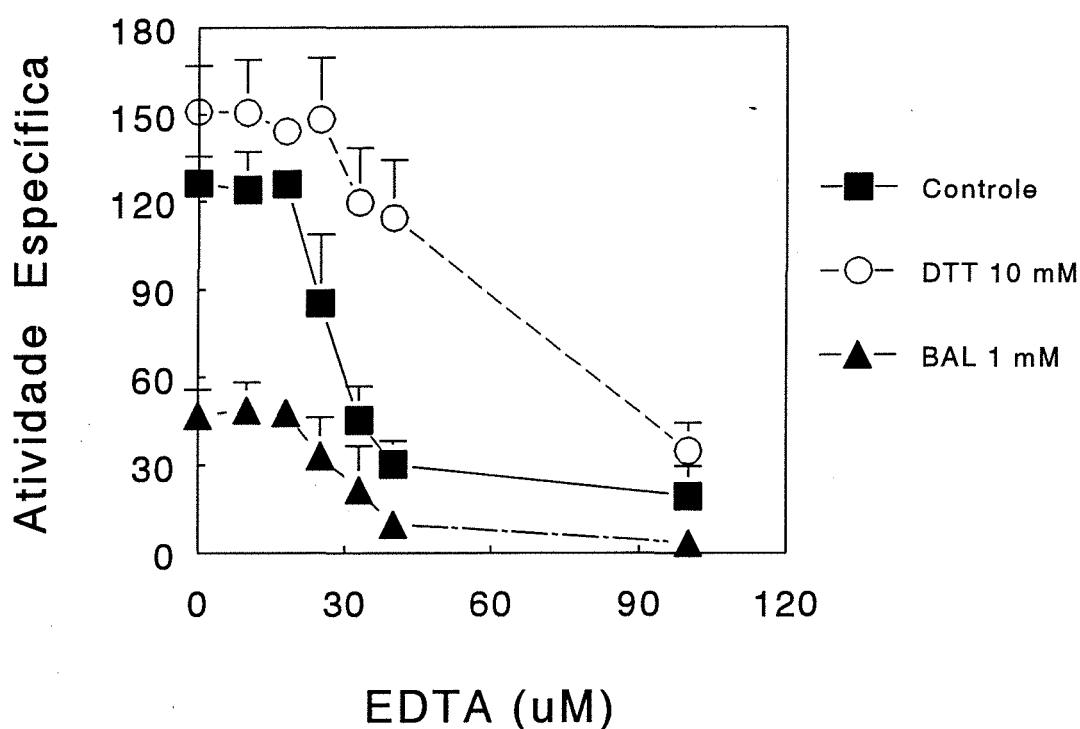


FIGURA 11 - Efeito do EDTA (0, 10, 18, 25, 33, 40 e 100 μM) sobre a atividade da ALA-D hepática, *in vitro*, com 10 min de pré-incubação, na presença de DTT 10 mM ou BAL 1 mM. A ALA-D hepática foi pré-incubada com EDTA e/ou BAL ou DTT (adicionados simultaneamente), durante 10 min, antes do início da reação enzimática. A reação era iniciada pela adição do substrato. A atividade específica da ALA-D é expressa como nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína. Cada ponto corresponde à média de 4 experimentos \pm E.P.

(Figura 10A), um quelante de cátions divalentes que inibe a ALA-D de fígado de camundongos a partir de 25 μM (Figura 11). Após adição de 25 μM de ZnCl_2 , concentração a partir da qual a inibição da ALA-D pelo BAL reduzido (500 μM) foi prevenida (Figuras 9B e C) - a uma solução de 500 μM de BAL reduzido, começa a aparecer zinco no estado livre (Figura 10B). A forma oxidada do BAL (500 μM) também foi capaz de quelar zinco, mas com menor afinidade que a sua forma reduzida (Figura 10A).

Esses resultados corroboram a hipótese de que o BAL inibe a ALA-D por quelar zinco. No entanto, como a ALA-D de cérebro de camundongos não é inibida pelo BAL, provavelmente existe algum outro fator envolvido nessa inibição.

Existem evidências na literatura (TSUKAMOTO et al., 1979; GIBBS et al., 1985) demonstrando que o zinco teria a função de manter grupos -SH da enzima no estado reduzido. TSUKAMOTO et al. (1979) demonstraram que após a remoção de zinco por EDTA os grupos -SH da ALA-D de fígado bovino são facilmente oxidados, levando à perda da atividade enzimática. Deste modo, o BAL pode estar removendo íons zinco (não essenciais para a catálise enzimática), tornando a enzima mais susceptível à oxidação, e conseqüentemente, à perda da atividade. A preparação tecidual de cérebro poderia ser mais pobre em agentes oxidantes, por isso esta enzima não apresentaria perda de atividade em presença de BAL. Além disso sabe-se que o BAL é um ditiol que sofre autooxidação e essa autooxidação pode ter um papel na inibição da ALA-D pelo BAL.

Para verificar se os íons zinco ligados a ALA-D de camundongos possuem uma função antioxidante, investigou-se o efeito do DTT (um ditiol usado para manter grupos -SH no estado reduzido) sobre a inibição da ALA-D hepática por EDTA (Figura 11). Os resultados demonstram que o DTT (10 mM) é capaz de reverter completamente a inibição da ALA-D por EDTA até uma concentração de 40 μM , indicando que estavam sendo removidos íons zinco envolvidos na manutenção da enzima no estado reduzido. Por outro lado, a inibição da ALA-D por 100 μM de EDTA não foi revertida por DTT (10mM), indicando que o EDTA é capaz de remover íons zinco mais fortemente ligados à enzima. Provavelmente este sítio de íons zinco não está envolvido na estabilização do estado reduzido da ALA-D, mas é essencial para a atividade enzimática.

Sabendo que a remoção de íons zinco ligados ao sítio mais lábil torna a enzima susceptível à inibição por oxidação e que esta inibição pode ser revertida por DTT, investigou-se o efeito do DTT (0-10 mM) sobre a inibição da ALA-D renal e hepática pelo BAL (0-1 mM) e sobre a atividade da ALA-D cerebral em presença de BAL (0-1 mM) (Figuras 12A, B e C). O DTT 10 mM reverteu completamente a inibição da ALA-D renal e hepática por BAL (até 1 mM), indicando que nestas concentrações o BAL inibe a ALA-D por remover íons zinco ligados ao sítio envolvido na estabilização dos grupos -SH da enzima. Na ausência de BAL, o DTT (10mM) aumentou a atividade da ALA-D cerebral (3,5 vezes), renal e hepática (1,5 vezes). Por outro lado foi observada uma inibição de 50% na atividade da ALA-D cerebral na presença de 1 mM de BAL e 500 μ M de DTT (Figura 12A).

3.3.2 - Papel da oxidação do BAL no seu efeito inibitório sobre a ALA-D

Além de ser capaz de quelar zinco, o BAL, por ser um ditiol, poderia também sofrer autooxidação, nas condições de ensaio da ALA-D e essa oxidação poderia ter uma participação na inibição da ALA-D pelo BAL. Para verificar esta hipótese, foram realizados os experimentos descritos à seguir.

A figura 13 mostra a taxa de oxidação do BAL (500 μ M) nas mesmas condições utilizadas para o ensaio enzimático da ALA-D. A presença dos sobrenadantes (S_1) de fígado e rim provocou um aumento de aproximadamente 2 vezes na taxa de oxidação do BAL, enquanto que o sobrenadante cerebral provocou um aumento de 1,5 vezes nessa taxa.

Para determinar se o mecanismo de oxidação do BAL é o mesmo na presença e na ausência da preparação tecidual (S_1), investigou-se o efeito do EDTA (5 mM) em ambas as condições (Figuras 14A, B e C). O EDTA reduziu significativamente a oxidação do BAL apenas quando este composto foi incubado sem nenhuma preparação tecidual. Esses resultados são similares àqueles relatados por MISRA (1974) para oxidação do DTT e sugerem a participação de traços de metais de transição na oxidação do BAL na ausência de preparação tecidual. Entretanto, a oxidação do BAL na presença de sobrenadante tecidual (S_1) se processa por outro mecanismo, possivelmente relacionado a nossa preparação enzimática, que pode conter peroxidases que atuam sobre compostos tiólicos. Existe ainda a possibilidade de que a oxidação do

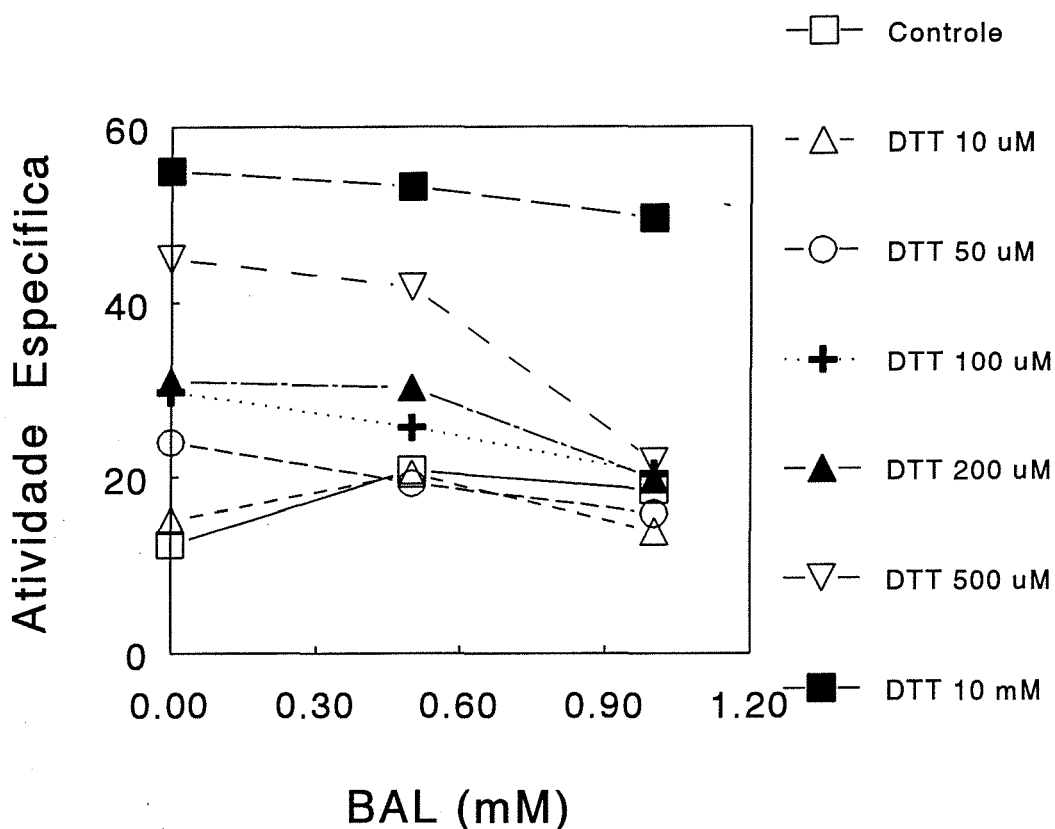
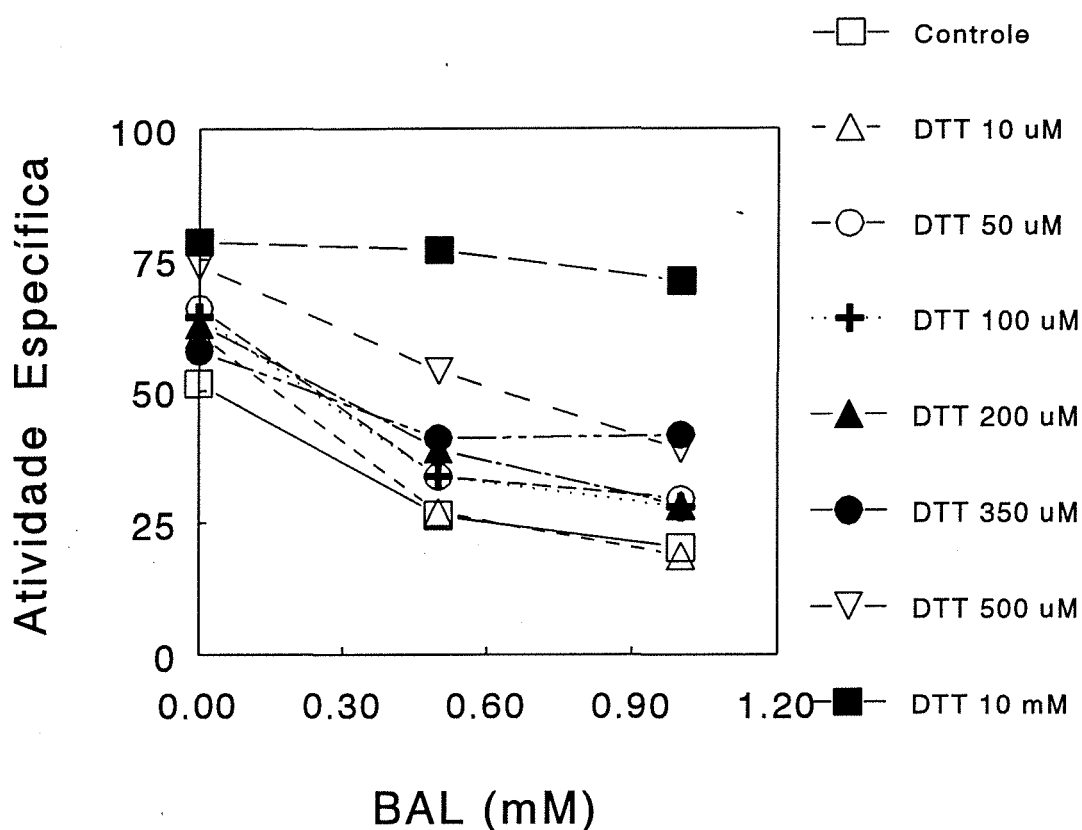


FIGURA 12A - Efeito do DTT (0, 10, 50, 100, 200, 500 μM e 10 mM) e do BAL (0, 0,5 e 1,0 mM) sobre a atividade da ALA-D cerebral, *in vitro*, com 10 min de pré-incubação. A ALA-D cerebral foi pré-incubada com BAL e/ou DTT (adicionados simultaneamente), durante 10 min, antes do início da reação enzimática. A reação era iniciada pela adição do substrato. A atividade específica da ALA-D é expressa como nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína (n=3). O erro padrão foi menor que 15% das respectivas médias.



UFRRGS
BIBLIOTECA SETORIAL DE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS

FIGURA 12B - Efeito do DTT (0, 10, 50, 100, 200, 350, 500 µM e 10 mM) e do BAL (0, 0,5 e 1,0 mM) sobre a atividade da ALA-D renal, *in vitro*, com 10 min de pré-incubação. A ALA-D renal foi pré-incubada com BAL e/ou DTT (adicionados simultaneamente), durante 10 min, antes do início da reação enzimática. A reação era iniciada pela adição do substrato. A atividade específica da ALA-D é expressa como nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína (n=3). O erro padrão foi menor que 15% das respectivas médias.

UFRRGS
BIBLIOTECA SETORIAL DO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS

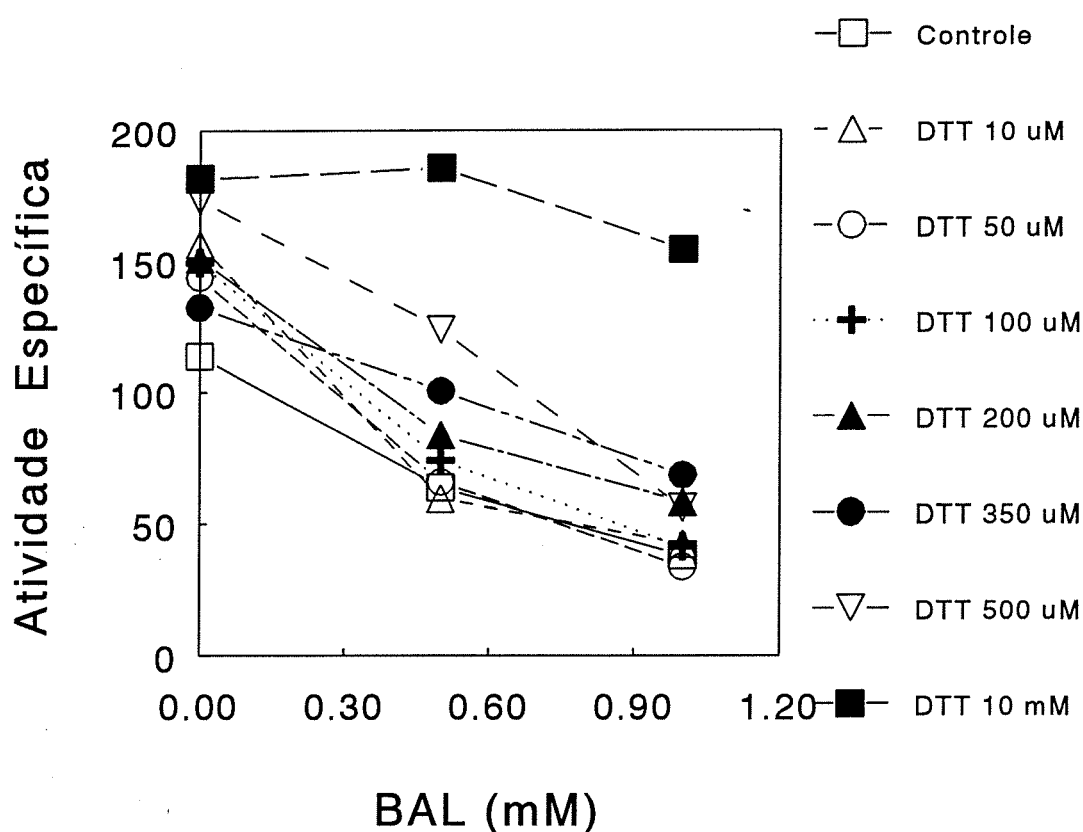


FIGURA 12C - Efeito do DTT (0, 10, 50, 100, 200, 350, 500 μ M e 10 mM) e do BAL (0, 0,5 e 1,0 mM) sobre a atividade da ALA-D hepática, *in vitro*, com 10 min de pré-incubação. A ALA-D hepática foi pré-incubada com BAL e/ou DTT (adicionados simultaneamente), durante 10 min, antes do início da reação enzimática. A reação era iniciada pela adição do substrato. A atividade específica da ALA-D é expressa como nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína (n=3). O erro padrão foi menor que 15% das respectivas médias.

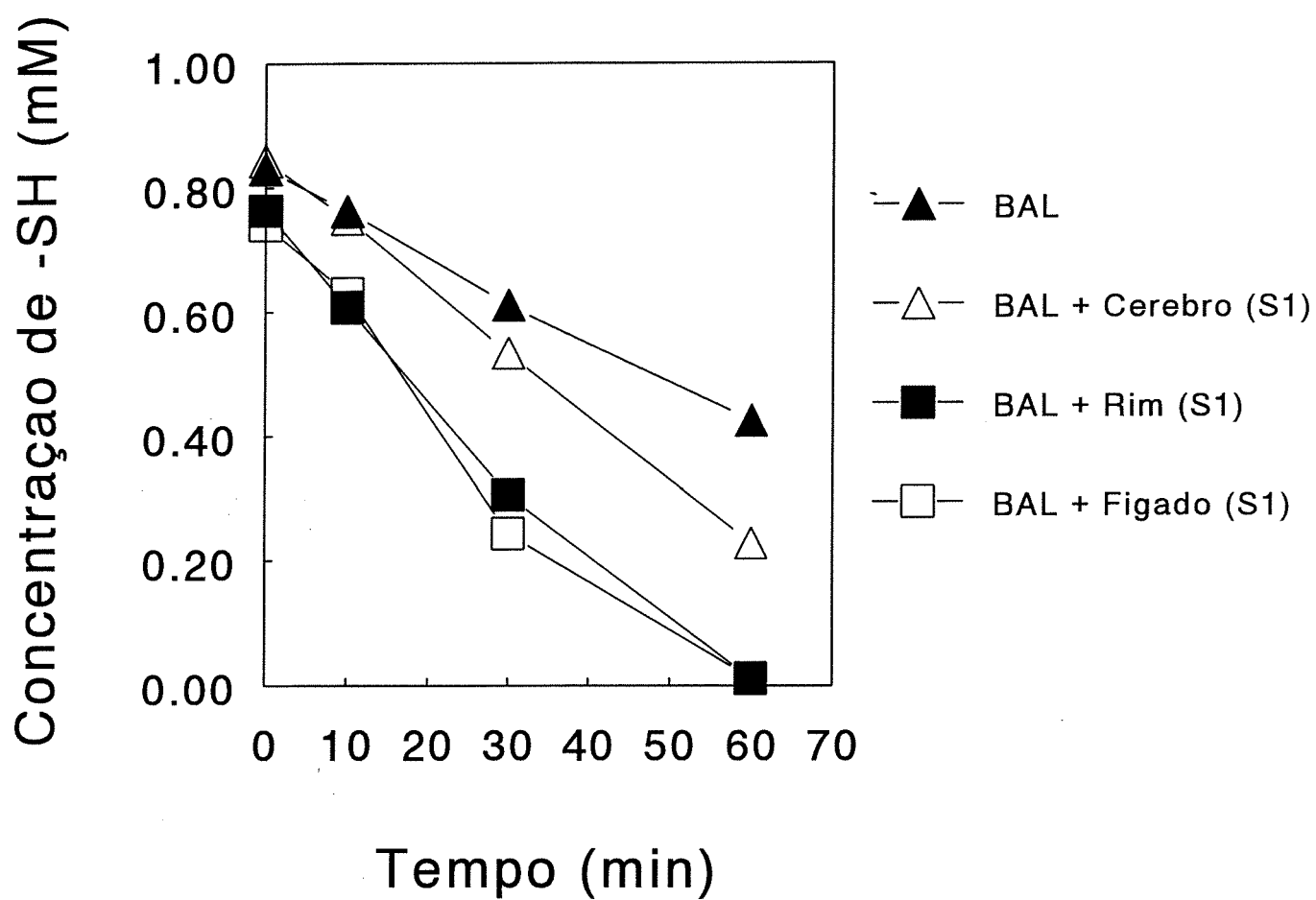


FIGURA 13 - Efeito dos sobrenadantes (S₁) de cérebro, rim e fígado sobre a velocidade de oxidação do BAL (500 μ M), nas mesmas condições utilizadas no ensaio para ALA-D (n=5). O erro padrão foi menor que 15% das respectivas médias.

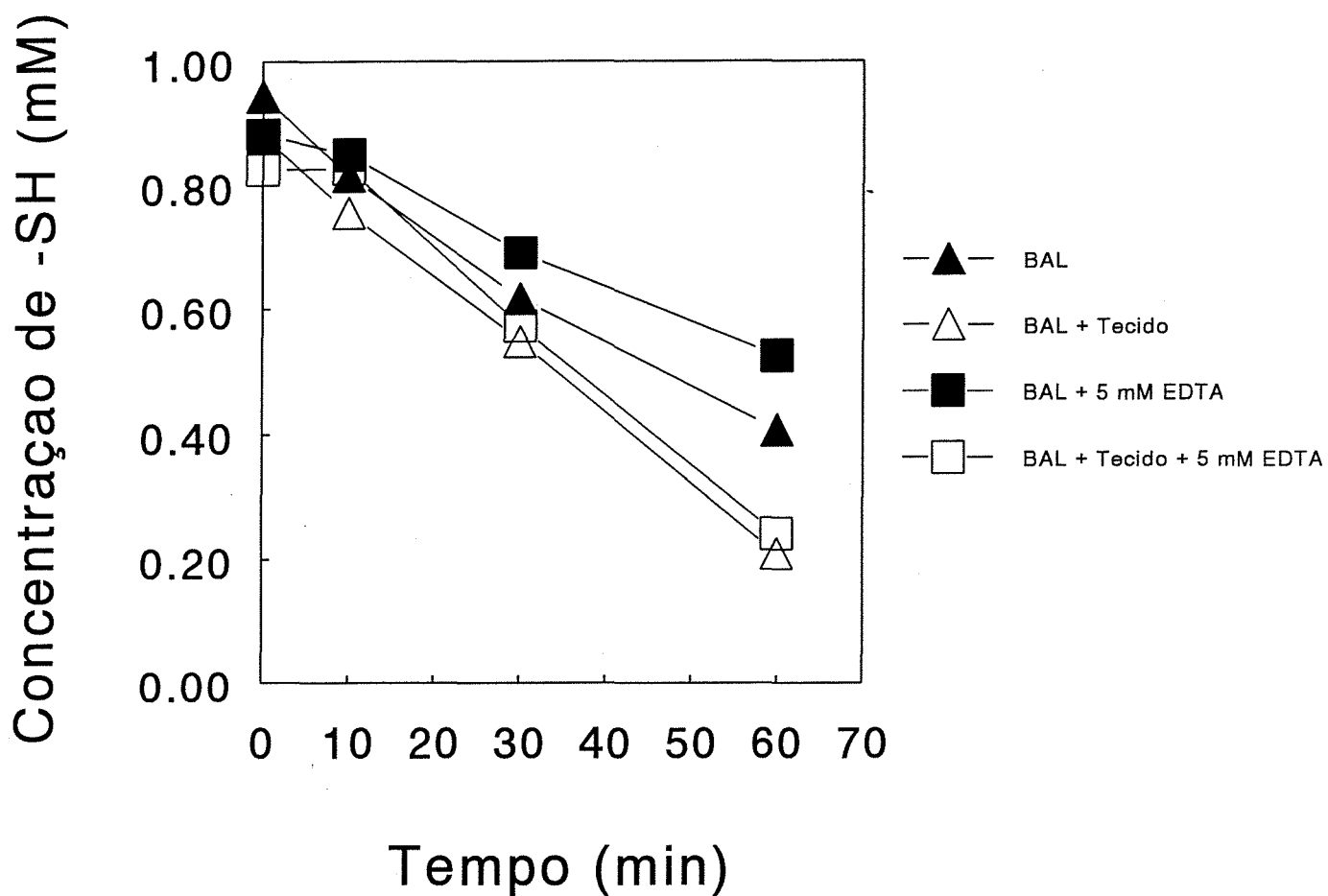


FIGURA 14A - Efeito do EDTA (5 mM) sobre a velocidade de oxidação do BAL na ausência e na presença do sobrenadante (S_1) de cérebro, nas mesmas condições utilizadas no ensaio para ALA-D ($n=5$). O erro padrão foi menor que 15% das respectivas médias.

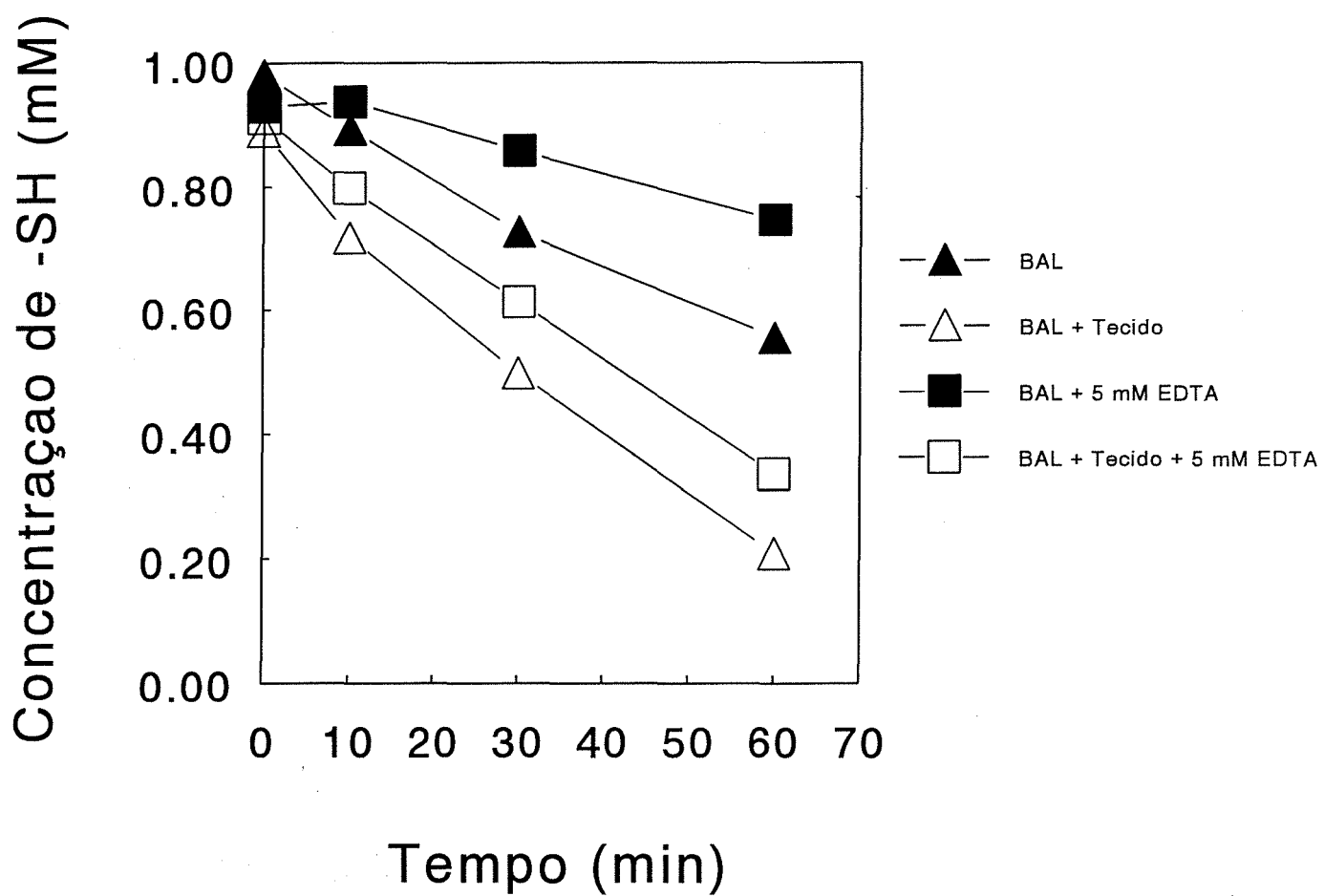


FIGURA 14B - Efeito do EDTA (5 mM) sobre a velocidade de oxidação do BAL na ausência e na presença do sobrenadante (S_1) de rim, nas mesmas condições utilizadas no ensaio para ALA-D ($n=5$). O erro padrão foi menor que 15% das respectivas médias.

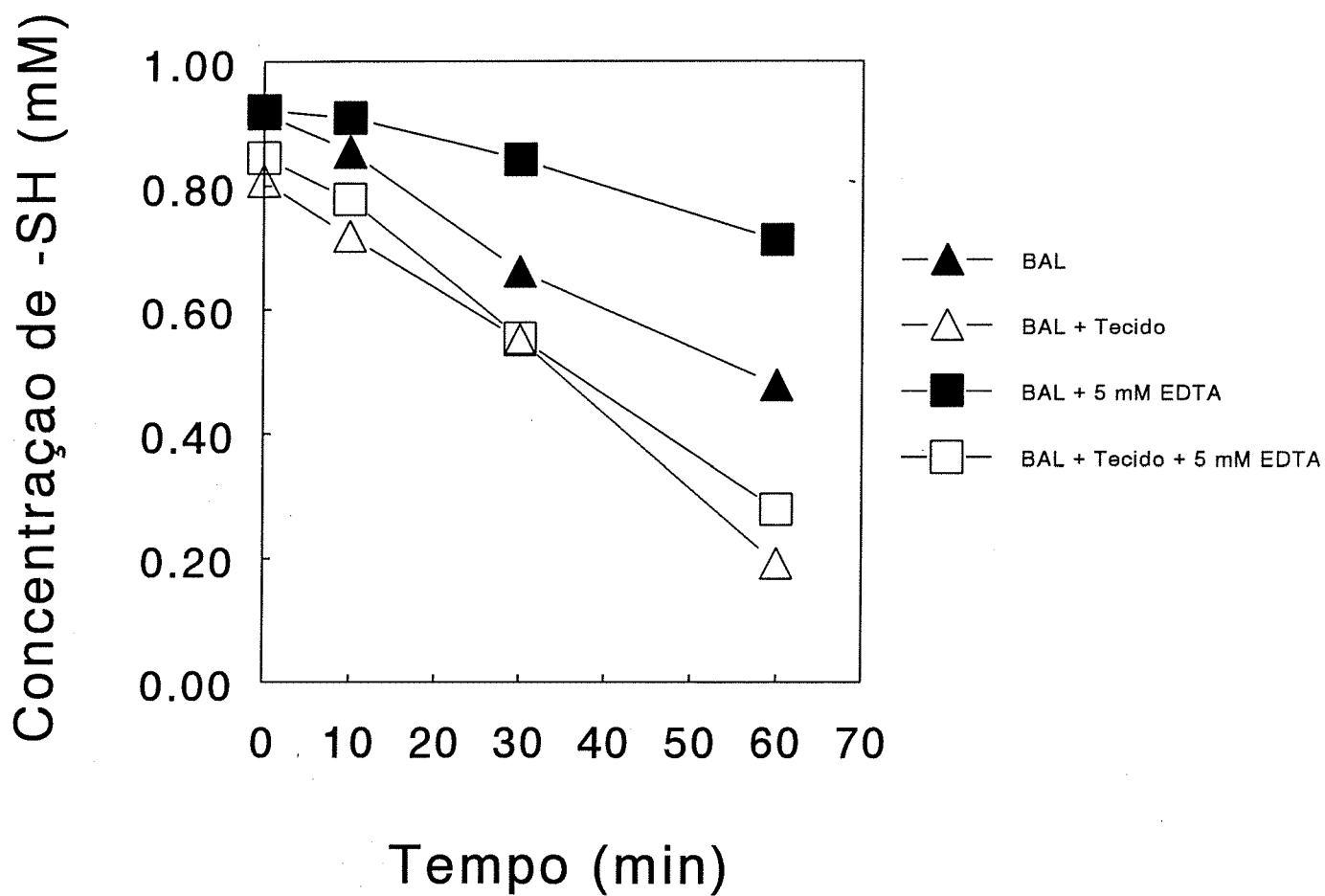


FIGURA 14C - Efeito do EDTA (5 mM) sobre a velocidade de oxidação do BAL na ausência e na presença do sobrenadante (S₁) de fígado, nas mesmas condições utilizadas no ensaio para ALA-D (n=5). O erro padrão foi menor que 15% das respectivas médias.

BAL esteja sendo mediada por metais de transição ligados a complexos biológicos, tais como o ferro da hemoglobina ou o cobre dos citocromos.

Não se pode descartar a participação da oxidação do BAL na inibição da ALA-D por este composto, uma vez que ele se oxida nas condições de ensaio da ALA-D. Neste caso, tanto espécies ativas de oxigênio formadas durante a oxidação do BAL, quanto o próprio BAL oxidado poderiam estar colaborando para a inibição da ALA-D pelo BAL.

Na literatura existem evidências de uma ação antioxidante do zinco (TAMMY & BETTGER, 1990). Como o papel protetor do zinco na inibição da ALA-D pelo BAL poderia ser atribuído a um efeito antioxidante do zinco, investigou-se o efeito desse metal sobre a velocidade de oxidação do BAL na presença e na ausência das preparações teciduais. A taxa de oxidação do BAL foi significativamente reduzida pelo zinco tanto na ausência de preparação tecidual (100-500 μM de ZnCl_2) (Figura 15A), quanto na presença de sobrenadante cerebral, renal (100-500 μM de ZnCl_2) (Figuras 15B e C), e hepático (500 μM de ZnCl_2) (Figura 15D). Apesar do zinco ter reduzido a velocidade de oxidação do BAL, ele só foi efetivo em concentrações bem maiores que aquelas capazes de reverter a inibição da ALA-D pelo BAL.

O IC_{50} para inibição da ALA-D renal e cerebral pelo BAL oxidado foi de aproximadamente 1 mM, enquanto que para a enzima hepática este valor foi de aproximadamente 2 mM (dados não mostrados). A inibição da ALA-D de cérebro, rim e fígado de camundongos pelo BAL oxidado (0,5-1 mM) não foi revertida por ZnCl_2 25 μM (dados não mostrados).

3.3.2.1 - Participação de espécies ativas de oxigênio na inibição da ALA-D pelo BAL

Primeiramente investigou-se a sensibilidade da ALA-D a H_2O_2 e OH^\bullet (radical hidroxil). O radical hidroxil foi gerado por reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$), determinando-se a atividade da ALA-D pré-incubada na presença de 50 μM de Fe^{2+} , 1 mM de H_2O_2 e 6 mM de ascorbato. O H_2O_2 , até a concentração de 1 mM, não inibiu a atividade da ALA-D cerebral, renal e hepática (Figura 16). Por outro lado, a ALA-D cerebral, renal e hepática foram inibidas pelo ascorbato (50, 50 e 40%,

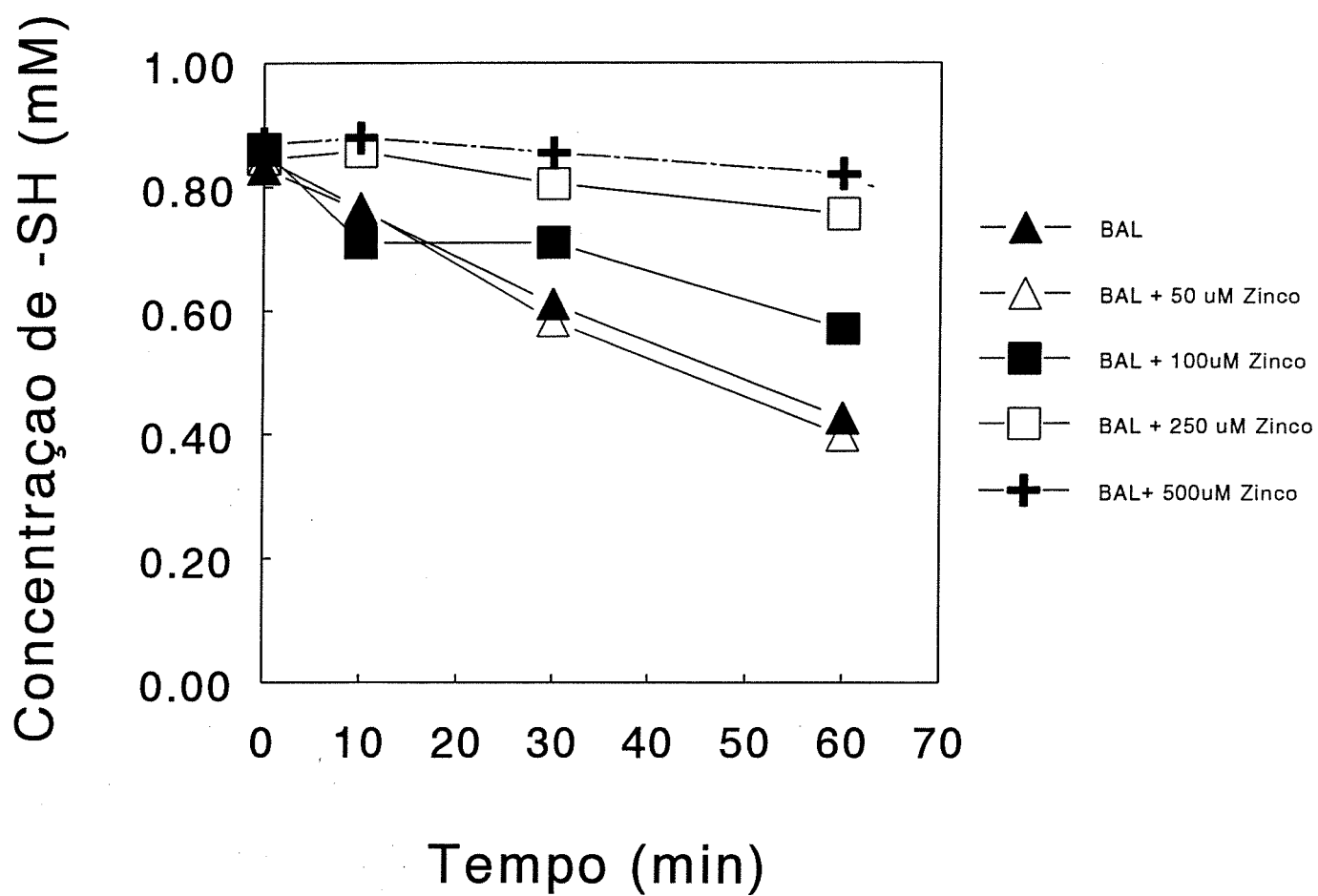


FIGURA 15A - Efeito do ZnCl_2 (0, 50, 100, 250 e 500 μM) sobre a velocidade de oxidação do BAL (500 μM) na ausência de sobrenadantes teciduais, nas mesmas condições utilizadas nos ensaios para ALA-D ($n=5$). O erro padrão foi menor que 15% das respectivas médias.

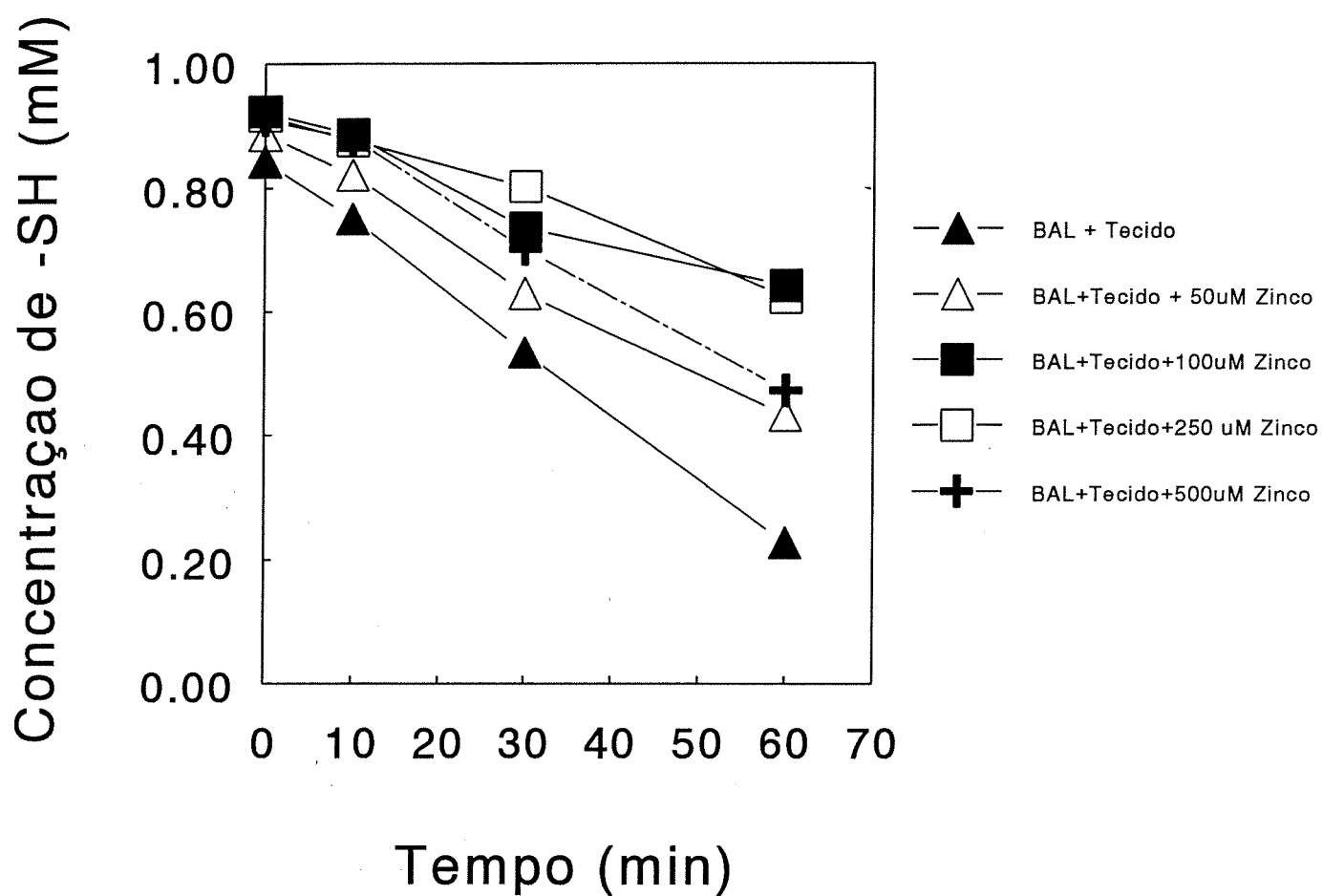


FIGURA 15B - Efeito do ZnCl_2 (0, 50, 100, 250 e 500 μM) sobre a velocidade de oxidação do BAL (500 μM) na presença do sobrenadante (S_1) de cérebro de camundongos, nas mesmas condições utilizadas nos ensaios para ALA-D ($n=5$). O erro padrão foi menor que 15% das respectivas médias.

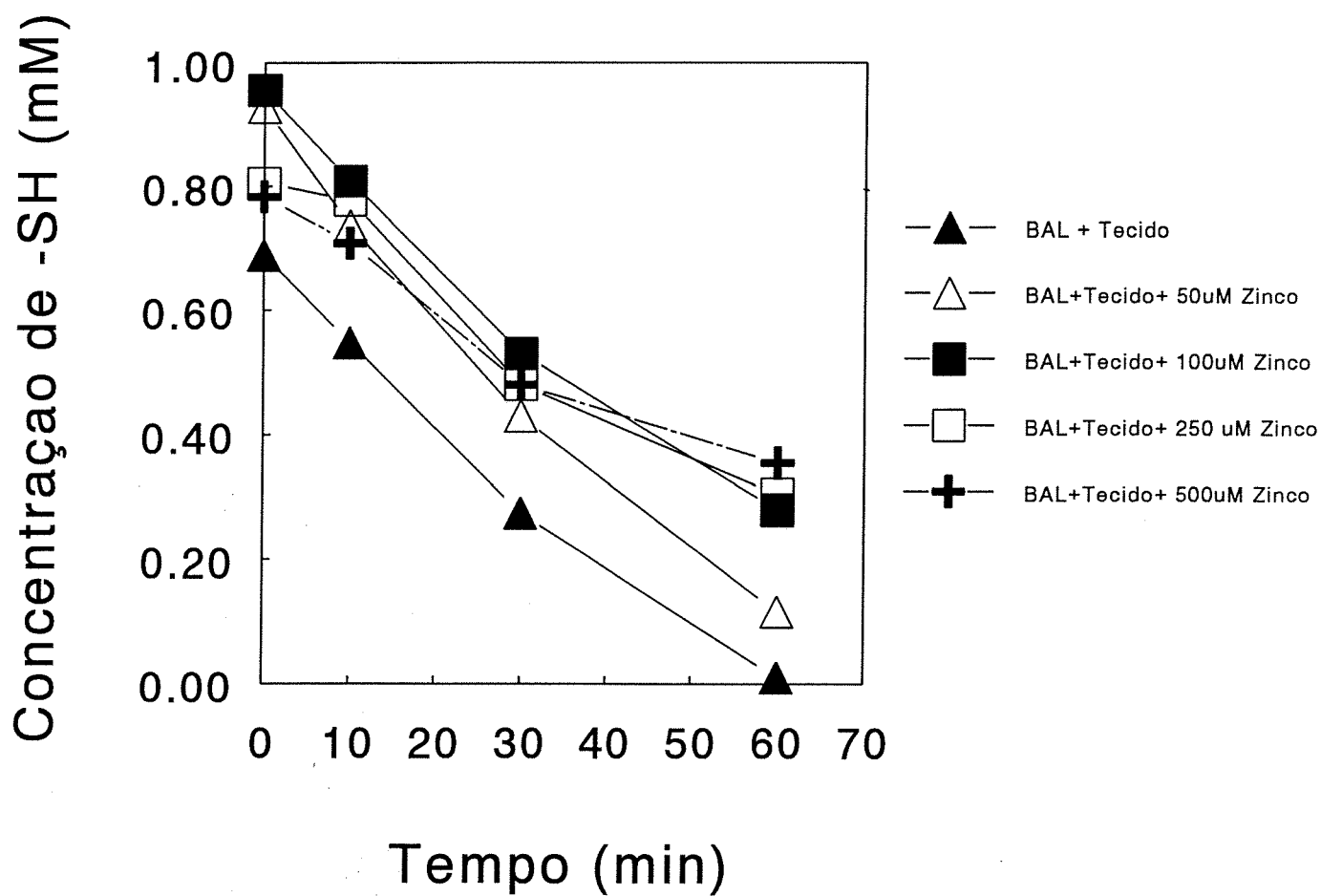


FIGURA 15C - Efeito do ZnCl_2 (0, 50, 100, 250 e 500 μM) sobre a velocidade de oxidação do BAL (500 μM) na presença do sobrenadante (S_1) de rim de camundongos, nas mesmas condições utilizadas nos ensaios para ALA-D (n=5). O erro padrão foi menor que 15% das respectivas médias.

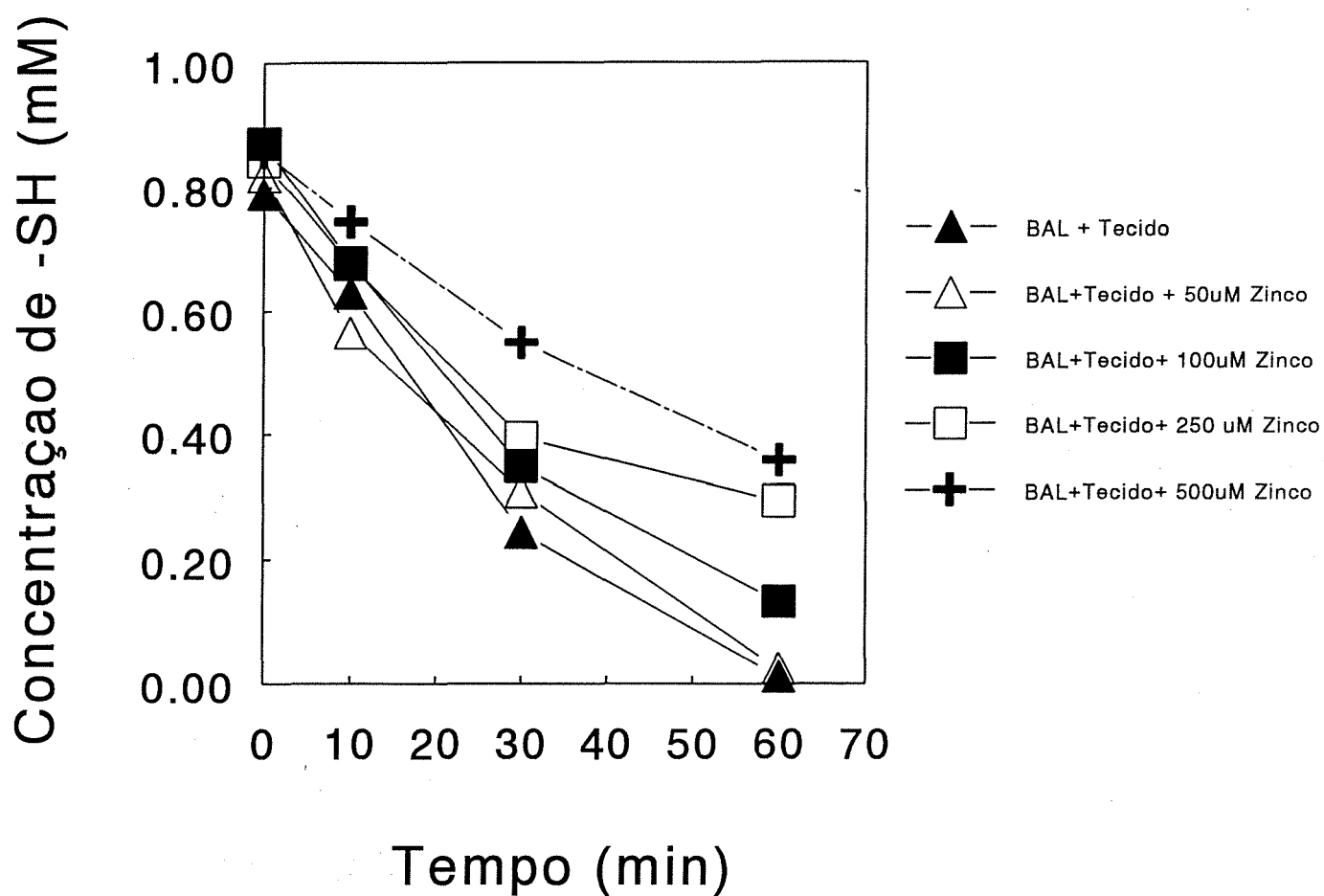


FIGURA 15D - Efeito do $ZnCl_2$ (0, 50, 100, 250 e 500 μM) sobre a velocidade de oxidação do BAL (500 μM) na presença do sobrenadante (S_1) de fígado de camundongos, nas mesmas condições utilizadas nos ensaios para ALA-D ($n=5$). O erro padrão foi menor que 15% das respectivas médias.

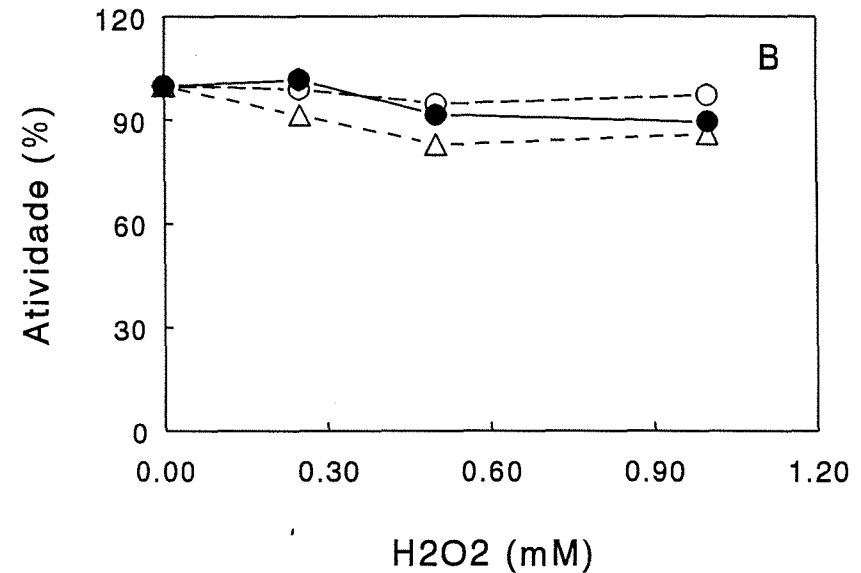
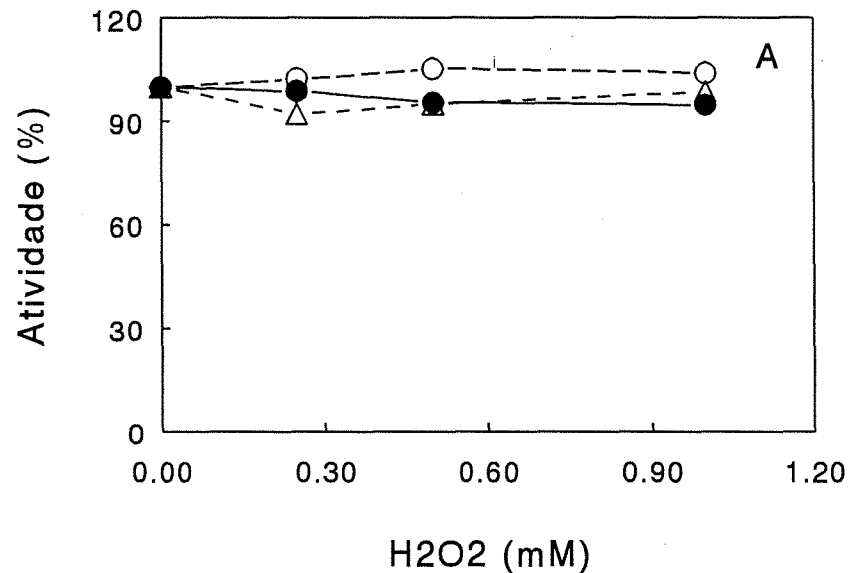


FIGURA 16 - Efeito do H₂O₂ (0, 0,25, 0,5 e 1,0 mM) sobre a atividade da ALA-D cerebral, renal e hepática, sem pré-incubação (A) e com 10 min de pré-incubação (B). Nos experimentos com pré-incubação a ALA-D foi pré-incubada com H₂O₂, durante 10 min, antes do início da reação. A reação era iniciada pela adição do substrato. Nos experimentos sem pré-incubação a reação era iniciada pela adição da preparação tecidual (enzima) a um meio contendo H₂O₂ e substrato. A atividade da ALA-D é expressa como percentagem em relação à atividade do controle (0 mM de H₂O₂) (n=3). Nos experimentos sem pré-incubação, as atividades específicas dos controles de cérebro, rim e fígado foram, respectivamente, 204,8 ± 18,1, 88,4 ± 6,1, 43,8 ± 4,9 nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína. Nos experimentos com pré-incubação, as atividades específicas dos controles de cérebro, rim e fígado foram, respectivamente, 141,7 ± 12,1, 78,3 ± 5,4 e 32,5 ± 4,1 nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína. O erro padrão foi menor que 15% das respectivas médias. -●- Cérebro, -Δ- rim, -○- fígado.

TABELA 7 - Efeito do H₂O₂ e do radical hidroxil sobre a atividade da ALA-D de cérebro, rim e fígado de camundongos adultos, com 10 min de pré-incubação.

	CÉREBRO	RIM	FÍGADO
Controle	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
FeCl ₂	90,9 ± 3,3	90,9 ± 5,6	96,2 ± 4,4
H ₂ O ₂	91,2 ± 6,7	90,9 ± 4,1	101,3 ± 5,6
Ascorbato	51,2 ± 5,5 *	54,8 ± 3,4 *	63,9 ± 3,7 *
FeCl ₂ + H ₂ O ₂ + Ascorbato	42,1 ± 3,6 *	49,7 ± 4,1 *	60,5 ± 3,6 *
Ascorbato + H ₂ O ₂	47,4 ± 2,2 *	51,9 ± 6,0 *	65,8 ± 2,2 *
Ascorbato + FeCl ₂	44,5 ± 2,7 *	43,1 ± 3,1 *	69,0 ± 4,1 *
FeCl ₂ + H ₂ O ₂	85,4 ± 6,0 *	95,6 ± 5,4	106,4 ± 6,7

As concentrações utilizadas foram : 50 µM de FeCl₂, 1 mM de H₂O₂ e 6 mM de ascorbato. O radical hidroxil era formado através da reação de Fenton, pela adição de simultânea de Fe²⁺, H₂O₂ e ascorbato. Dados expressos como % de atividade em relação ao grupo controle (média ± E.P.) (n=3). As atividades específicas dos controles de cérebro, rim e fígado foram, respectivamente, 148,4, 73,6 e 28,9 nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína. * Significativamente diferente do controle.

TABELA 8 - Efeito da superóxido dismutase (SOD), NADH e manitol sobre a inibição da ALA-D pelo BAL, com 10 min de pré-incubação.

	FÍGADO	RIM	CÉREBRO
CONTROLE	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
NADH 0,1 mM	96,8 ± 6,5	96,3 ± 1,9	104,9 ± 7,4
Manitol	103,4 ± 5,5	98,4 ± 4,8	85,2 ± 2,9
NADH 0,1mM + Manitol	78,3 ± 11,6	91,5 ± 5,8	90,4 ± 4,5
NADH 2 mM	49,8 ± 21,1*	76,3 ± 6,9*	96,1 ± 7,0
SOD	81,3 ± 6,1	99,5 ± 4,2	101,8 ± 7,4
SOD + Manitol	81,5 ± 7,3	101,2 ± 3,4	93,7 ± 7,8
BAL	55,9 ± 10,4*	70,8 ± 3,5*	203,1 ± 21,2*
BAL + NADH 0,1 mM	50,4 ± 7,9*	72,0 ± 7,5*	206,0 ± 21,2*
BAL + Manitol	56,3 ± 5,1*	75,7 ± 6,8*	166,5 ± 11,4*
BAL + NADH 0,1 mM + Manitol	46,4 ± 7,9*	73,7 ± 4,7*	205,6 ± 18,9*
BAL + NADH 2 mM	25,6 ± 3,1*	48,9 ± 7,8 ^a	131,0 ± 23,5 ^a
BAL + SOD	48,3 ± 2,8*	62,5 ± 5,7*	151,4 ± 14,8 ^a
BAL + SOD + Manitol	44,0 ± 5,2*	40,8 ± 6,6 ^a	112,1 ± 9,8 ^a

A ALA-D foi pré-incubada com BAL (500 µM), manitol (1 mM), NADH (0,1 ou 2,0 mM) e/ou superóxido dismutase (315 U/ml) (adicionados simultaneamente), durante 10 min, antes do início da reação enzimática. A reação foi iniciada com a adição do substrato. Dados expressos como percentagem de atividade em relação ao grupo controle (média ± E.P.) (n= 5). As atividades dos grupos controles de cérebro, rim e fígado correspondem a 228,4, 73,3 e 29,8 nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína. * Significativamente diferente do controle. ^a Significativamente diferente do BAL.

respectivamente), mas essa inibição não foi potencializada pela adição de Fe^{2+} e/ou H_2O_2 (Tabela 7).

Investigou-se também o efeito do NADH 0,1 mM ("scavenger" de O_2^-) (KIDO & SODA, 1984), da superóxido dismutase 315 U/ml ("scavenger" de O_2^-) (FRIDOVICH, 1995) e do manitol 1 mM ("scavenger de OH^\bullet ") (NAKANISHI et al., 1985) sobre a inibição da ALA-D pelo BAL (Tabela 8) e sobre a velocidade de oxidação do BAL (Tabela 9). Nenhum desses "scavengers" foi capaz de prevenir a inibição da ALA-D pelo BAL ou a oxidação do BAL na presença de tecido (Tabelas 8 e 9, respectivamente).

3.3.3 - Efeito do BAL na atividade da ALA-D parcialmente purificada

Como a maioria dos resultados obtidos até então indicavam que a inibição da ALA-D pelo BAL é devido à remoção de íons zinco, tornando a enzima mais suscetível a oxidação por fatores teciduais, aparentemente ausentes na preparação cerebral, realizou-se uma purificação parcial da ALA-D renal e hepática, numa tentativa de eliminar esses fatores. Nestes ensaios enzimáticos utilizou-se 100 μM de DTT para manter a atividade da ALA-D parcialmente purificada. Como observado nas figuras 12B e C, esta concentração de DTT não interfere na inibição da ALA-D pelo BAL.

Para verificar a participação do oxigênio na inibição da ALA-D pelo BAL, o efeito do BAL sobre a atividade da ALA-D hepática, parcialmente purificada, não reativada, foi determinado em atmosfera natural e sob atmosfera de argônio (Figura 17). Observou-se que 0,5 e 1,0 mM de BAL provocaram um aumento significativo na atividade da ALA-D hepática parcialmente purificada, não reativada, enquanto que 29 mM de BAL provocou uma inibição significativa da enzima (Figura 17). Não foi observada diferença na atividade específica da ALA-D nem no efeito do BAL sobre a enzima incubada em atmosfera de argônio, quando comparada à incubada no ar.

No entanto, foi observado que a ALA-D parcialmente purificada, armazenada a -20°C e ensaiada nessas condições (Figura 17) apresentava uma atividade muito baixa, quando comparada a sua atividade máxima (atividade na presença de 10 mM de DTT e 10 μM de ZnCl_2) (Legenda da Figura 17) e que esta

TABELA 9 - Efeito do NADH, manitol e superóxido dismutase (SOD) na taxa de oxidação do BAL (500 μ M), nas mesmas condições utilizadas no ensaio para ALA-D.

	SEM TECIDO	CÉREBRO	RIM	FÍGADO
BAL	6,50 \pm 0,9	9,42 \pm 1,4*	11,91 \pm 0,3*	12,04 \pm 0,9*
BAL + NADH 0,1 mM	5,20 \pm 1,2	9,57 \pm 2,8*	10,19 \pm 0,5*	9,57 \pm 0,8*
BAL + NADH 2,0 mM	7,97 \pm 1,5	8,96 \pm 1,5	10,50 \pm 0,8*	9,42 \pm 0,8*
BAL + Manitol	7,95 \pm 1,2	8,03 \pm 1,4	8,34 \pm 1,1	10,65 \pm 0,9*
BAL + NADH 0,1 mM + Manitol	7,46 \pm 1,5	6,95 \pm 1,7	9,73 \pm 1,1*	8,96 \pm 1,1
BAL + SOD	8,35 \pm 1,4	8,34 \pm 1,1	12,20 \pm 0,8*	10,34 \pm 0,5*
BAL + SOD + Manitol	8,20 \pm 1,4	8,34 \pm 0,6	10,81 \pm 0,6*	10,19 \pm 0,6*

Os compostos acima foram utilizados nas seguintes concentrações: BAL 500 μ M, manitol 1mM e superóxido dismutase 315 U/ml. Dados expressos como nmoles de -SH oxidados/ml/min (média \pm E.P.). * Significativamente diferente da velocidade de oxidação do BAL sem tecido ($p < 0,05$).

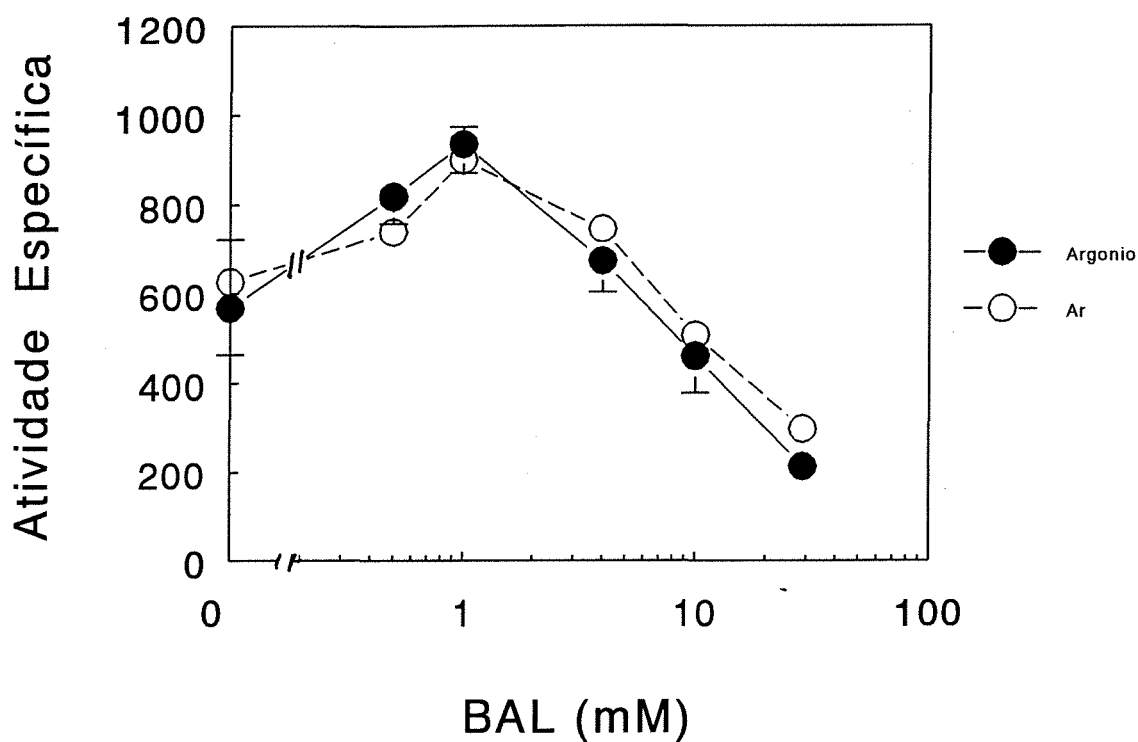


FIGURA 17 - Efeito do BAL (0, 0,5, 1, 4, 10 e 29 mM) sobre a atividade da ALA-D de figado de camundongos parcialmente purificada (P_{55}), **não reativada**, incubada no ar ou sob atmosfera de argônio, com 10 min de pré-incubação. A ALA-D hepática foi pré-incubada com BAL, durante 10 min, antes do início da reação enzimática. A reação era iniciada pela adição do substrato. O meio de incubação continha **100 μ M de DTT**. A atividade específica da ALA-D é expressa como nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína. Cada ponto corresponde a média de 4 experimentos \pm E.P. A atividade da ALA-D incubada no ar, na presença de **10 mM de DTT** e **10 μ M de $ZnCl_2$** foi de $1366,9 \pm 70,1$ nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína.

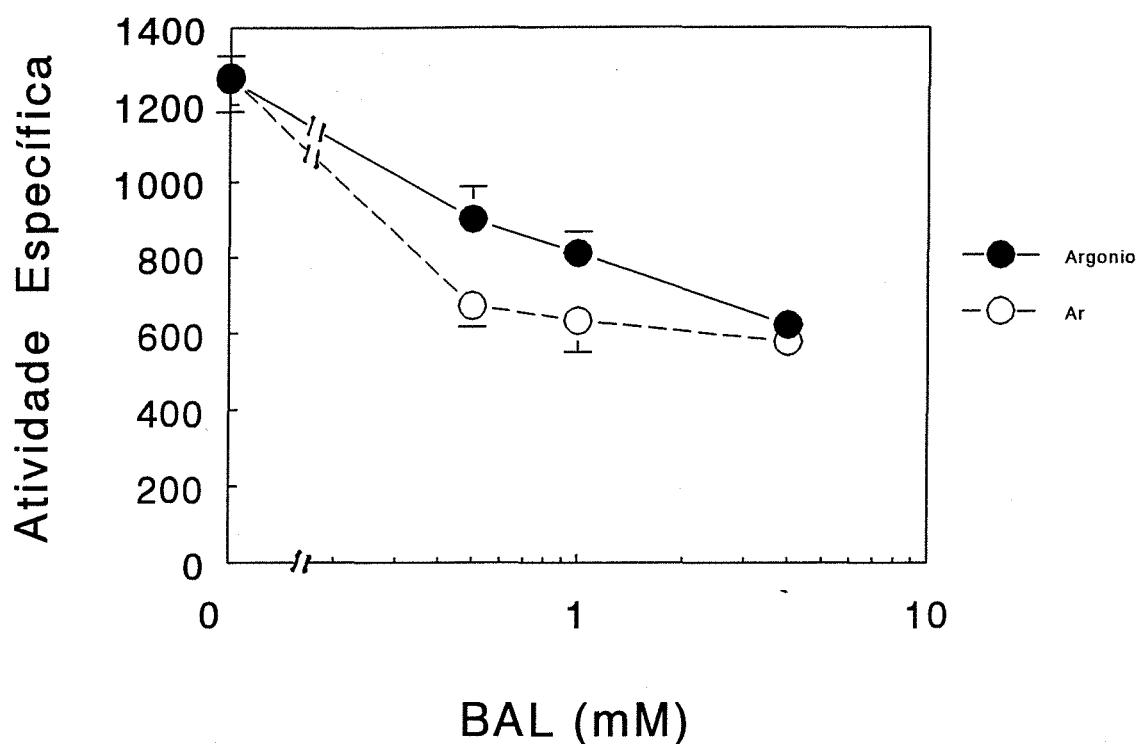


FIGURA 18 - Efeito do BAL (0, 0,5, 1 e 4 mM) sobre a atividade da ALA-D de fígado de camundongos parcialmente purificada (P_{55}), **reativada** (incubação com 10 mM de DTT e 20 μ M de $ZnCl_2$, a 45°C, por 15 min, antes de iniciar a reação enzimática), incubada no ar ou sob atmosfera de argônio, com 10 min de pré-incubação. A ALA-D hepática foi pré-incubada com BAL, durante 10 min, antes do início da reação enzimática. A reação era iniciada pela adição do substrato. O meio de incubação continha 100 μ M de DTT e 0,2 μ M de $ZnCl_2$. A atividade específica da ALA-D é expressa como nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína. Cada ponto corresponde à média de 4 experimentos \pm E.P. A atividade da ALA-D incubada no ar, na presença de 10 mM de DTT e 10 μ M de $ZnCl_2$ foi de $1601,9 \pm 156,6$ nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína.

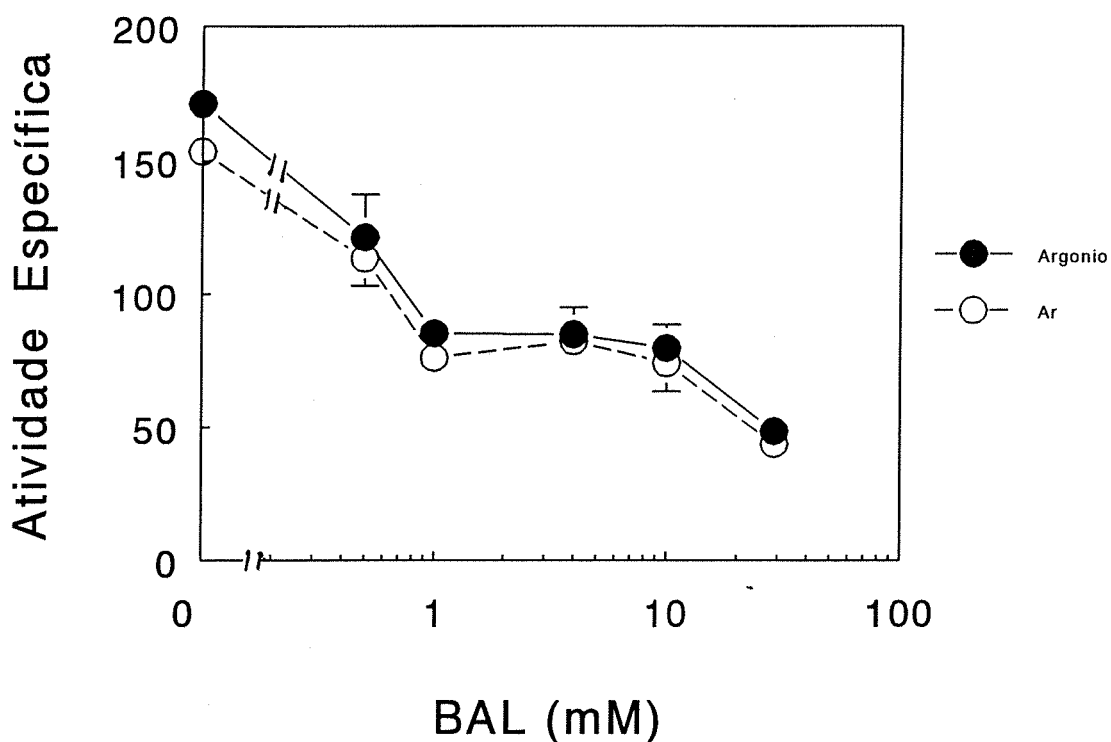


FIGURA 19 - Efeito do BAL (0, 0,5, 1, 4, 10 e 29 mM) sobre a atividade da ALA-D de fígado de camundongos (S_1), incubada no ar ou sob atmosfera de argônio, com 10 min de pré-incubação. A ALA-D hepática foi pré-incubada com BAL, durante 10 min, antes do início da reação enzimática. A reação era iniciada pela adição do substrato. O meio de incubação continha $100 \mu\text{M}$ de DTT. A atividade específica da ALA-D é expressa como nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína. Cada ponto corresponde à média de 4 experimentos \pm E.P. A atividade da ALA-D incubada no ar, na presença de 10 mM de DTT e $10 \mu\text{M}$ de ZnCl_2 foi de $175,2 \pm 10,2$ nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína.



atividade decrescia a cada dia (dados não mostrados). Por isto, passou a ser realizada uma reativação da ALA-D com DTT e zinco (ver Material e Métodos), antes de iniciar a incubação.

A concentração de 100 μM de DTT no meio de incubação foi mantida. A ALA-D hepática semi-purificada, reativada, apresentava uma atividade bem próxima da atividade máxima da enzima (Figura 18). No entanto esta enzima se comportou de modo semelhante a enzima não purificada (Figura 19), sendo inibida por BAL a partir de 500 μM , independente da incubação ter sido realizada sob atmosfera de argônio ou em atmosfera natural.

A ALA-D renal (Figura 20), parcialmente purificada, reativada comportou-se de modo semelhante à enzima hepática parcialmente purificada, ensaiada nas mesmas condições.

Investigou-se ainda, o efeito do BAL (0-4 mM) sobre a atividade da ALA-D de fígado bovino purificada, de fonte comercial (Sigma Co.) (Figura 21), reativada e incubada sob atmosfera natural ou de argônio, na presença de 100 μM de DTT. Esta enzima comportou-se frente ao BAL de modo semelhante às enzimas parcialmente purificadas, de rim e fígado de camundongo.

A velocidade de oxidação do BAL na ausência e na presença de preparações teciduais (ALA-D parcialmente purificada de fígado de camundongos e ALA-D comercial, purificada de fígado bovino), foi significativamente reduzida, quando este composto foi incubado sob atmosfera de argônio, quando comparada aos ensaios em atmosfera natural (dados não mostrados).

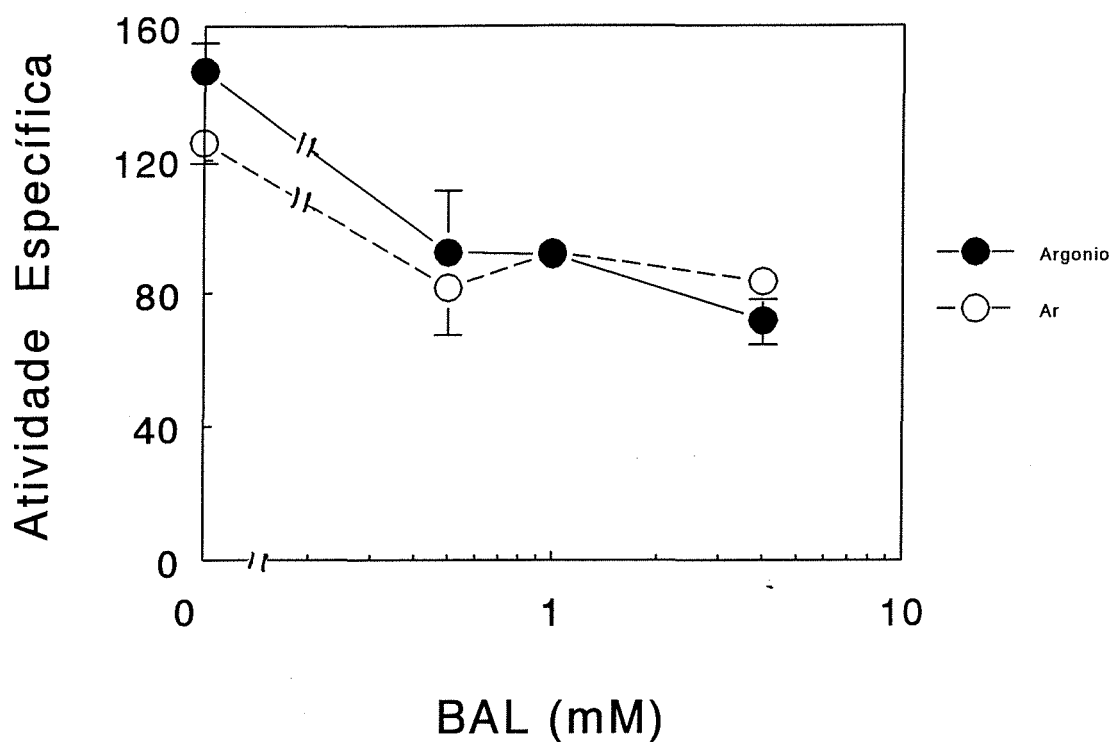


FIGURA 20 - Efeito do BAL (0, 0,5, 1 e 4 mM) sobre a atividade da ALA-D de rim de camundongos parcialmente purificada (P_{55}), **reativada**, incubada no ar ou sob atmosfera de argônio, com 10 min de pré-incubação. A ALA-D renal foi pré-incubada com BAL, durante 10 min, antes do início da reação enzimática. A reação era iniciada pela adição do substrato. O meio de incubação continha **100 μ M de DTT** e **0,2 μ M de $ZnCl_2$** . A atividade específica da ALA-D é expressa como nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína. Cada ponto corresponde à média de 3 experimentos \pm E.P. A atividade da ALA-D incubada no ar, na presença de **10 mM de DTT** e **10 μ M de $ZnCl_2$** foi de $156,2 \pm 10,76$ nmol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína.

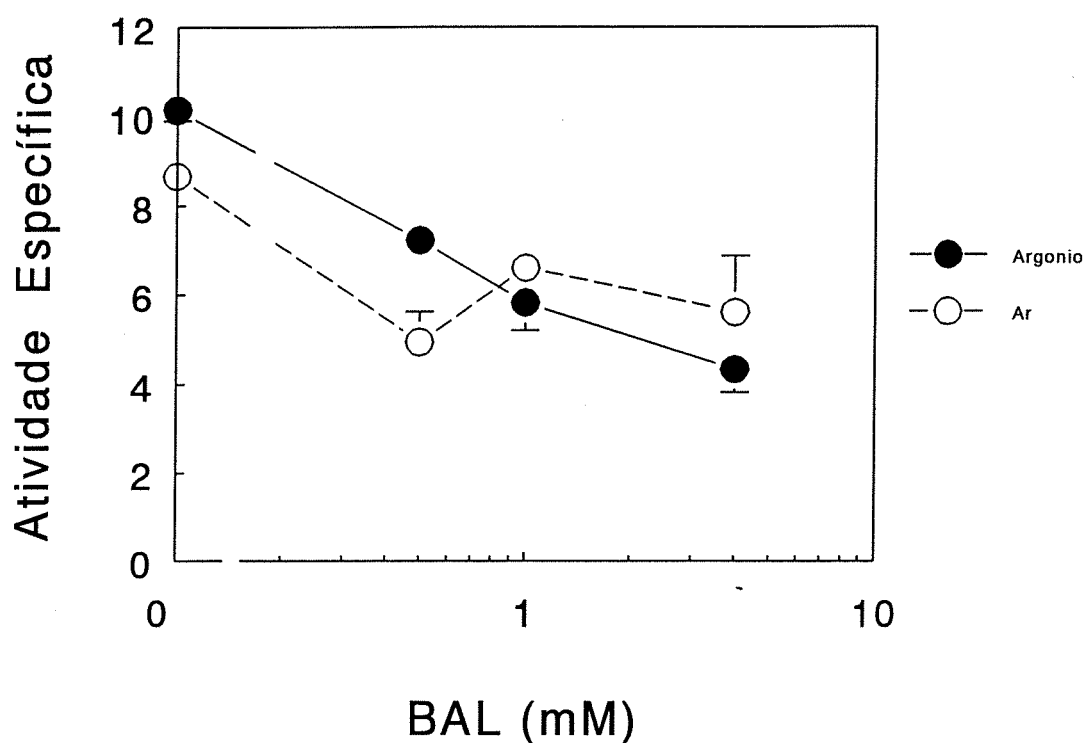


FIGURA 21 - Efeito do BAL (0, 0,5, 1 e 4 mM) sobre a atividade da ALA-D de fígado bovino purificada (Sigma Co.), **reativada**, incubada no ar ou sob atmosfera de argônio, com 10 min de pré-incubação. A ALA-D hepática foi pré-incubada com BAL, durante 10 min, antes do início da reação enzimática. A reação era iniciada pela adição do substrato. O meio de incubação continha **100 μ M de DTT** e **0,2 μ M de $ZnCl_2$** . A atividade específica da ALA-D é expressa como μ mol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína. Cada ponto corresponde à média de 3 experimentos \pm E.P. A atividade da ALA-D incubada no ar, na presença de **10 mM de DTT** e **10 μ M de $ZnCl_2$** foi de $14,5 \pm 0,9$ μ mol de porfobilinogênio formado/h/mg de proteína.

4.0 - DISCUSSÃO

4.1 - Intoxicação com cloreto de mercúrio e tratamento com BAL

Os resultados do presente estudo demonstraram que após a administração subcutânea de mercúrio inorgânico a camundongos adultos, o rim é o órgão mais afetado (peso do órgão, razão peso do órgão/peso corporal e atividade da ALA-D), seguido do fígado (atividade da ALA-D). Os camundongos injetados com 3 doses de HgCl_2 4,6 mg/kg apresentaram um aumento na concentração de uréia sérica, indicando prejuízo da função renal (DASTON et al., 1983). A maior inibição da ALA-D renal após o tratamento com cloreto de mercúrio *in vivo* deve estar relacionada ao maior acúmulo do metal neste órgão, uma vez que a ALA-D cerebral, renal e hepática apresentaram sensibilidades similares ao HgCl_2 , *in vitro* (Tabela 6). Estes resultados estão de acordo com relatos prévios, demonstrando que o rim, seguido do fígado, são os órgãos que apresentam maior acúmulo de mercúrio em termos de quantidades totais, independentemente da via de administração (MAGOS et al., 1982; BERLIN, 1986; NIELSEN & ANDERSEN, 1989; 1990).

O conteúdo de mercúrio renal foi similar após a administração de 2,3 ou 4,6 mg/kg HgCl_2 , possivelmente porque deve existir um limite para a deposição de mercúrio neste órgão. Este fenômeno já foi observado anteriormente, após intoxicação oral com cloreto de mercúrio (NIELSEN & ANDERSEN, 1991). Além disso, NIELSEN & ANDERSEN (1990) demonstraram que a percentagem de mercúrio que se deposita no rim tende a diminuir a medida que se aumenta a dose de HgCl_2 . Estes resultados podem estar relacionados a um maior dano nos túbulos renais, com aumento da diurese e da excreção urinária de mercúrio no animal exposto a maiores doses do metal (NIELSEN & ANDERSEN, 1989).

A atividade da ALA-D cerebral não foi inibida por 3 injeções de HgCl_2 2,3 ou 4,6 mg/kg, independente do tratamento com BAL. Este resultado pode ser atribuído aos baixos níveis de mercúrio detectados neste órgão, mesmo após a administração da maior dose do metal. Isto ocorreu provavelmente devido à baixa permeabilidade da barreira hematoencefálica ao mercúrio inorgânico (NIELSEN & ANDERSEN, 1989; 1990; MØLLER-MADSEN, 1994). No entanto, como a distribuição do mercúrio no cérebro, após a administração de cloreto de mercúrio, é muito heterogênea, não se pode descartar a possibilidade de que a ALA-D de alguma

região específica do cérebro esteja sendo inibida, devido a uma maior deposição de mercúrio. Esta eventual inibição pode não ter sido detectada, pois nos ensaios utilizou-se cérebro total. O aumento no conteúdo de mercúrio observado no cérebro dos animais tratados com 4,6 mg/kg de HgCl₂ e BAL está de acordo com outros estudos que demonstram que o BAL aumenta a deposição de mercúrio e outros metais tóxicos no cérebro (HOOVER & APOSHIAN, 1983; KIYOZUMI et al., 1988; HILMY et al., 1991).

Os resultados do presente estudo demonstram que o BAL apresentou um efeito pequeno sobre a inibição da ALA-D hepática, após exposição a HgCl₂. Inesperadamente, o BAL aumentou a potência inibitória do HgCl₂ sobre a atividade da ALA-D renal.

Apesar do BAL ser usado no tratamento de intoxicações com cloreto de mercúrio, ele apresenta uma baixa eficácia terapêutica (CHISOLM, 1970). Os possíveis alvos celulares e moleculares da toxicidade do BAL ainda são pouco conhecidos. Além disso, recentemente, ENDO & SAKATA (1995) demonstraram em cultura primária de células epiteliais de córtex renal de ratos, que o BAL é capaz de remover a maioria do mercúrio previamente depositado. No entanto, ele aumenta a citotoxicidade e a acumulação do metal, quando adicionado simultaneamente com o mercúrio.

4.2 - Efeito do BAL e do HgCl₂ sobre a atividade da ALA-D *in vitro*

Como o efeito do BAL, *in vivo*, potencializando a inibição da ALA-D renal pelo HgCl₂ não era esperado, investigou-se os efeitos do HgCl₂ e do BAL isoladamente e combinados sobre a atividade da ALA-D, *in vitro*. O BAL, quando pré-incubado com a ALA-D renal e hepática causou uma inibição significativa da atividade da enzima. Isto indica que o BAL ou algum derivado do BAL age no sítio ativo da enzima, uma vez que o ALA é capaz de proteger a enzima da inibição. O BAL é um ditiol, que devido a fatores estéricos é prontamente oxidado na presença de agentes oxidantes (BARRON et al., 1947; PHILIPSON, 1962), o que pode contribuir para o efeito inibitório deste composto, após pré-incubado com a ALA-D. O BAL poderia ser reduzido às custas da oxidação da ALA-D. MISRA (1974) demonstrou que a autooxidação de tióis gera radicais livres. Estes radicais poderiam contribuir para oxidar a

ALA-D. No entanto, já que a enzima cerebral não foi inibida após 10 min de pré-incubação com o BAL, não se pode descartar a participação de algum fator tecidual específico na oxidação do BAL. O efeito inibitório do BAL também pode estar relacionado à propriedade quelante inespecífica deste composto, que removeria íons zinco essenciais para a atividade da ALA-D (TARUI, 1960; CORNELL & CRIVARO, 1972; TSUKAMOTO, 1979). A sensibilidade da ALA-D ao HgCl_2 , *in vitro*, e o aumento dessa sensibilidade após 10 min de pré-incubação foram similares em todos os tecidos testados. Este aumento na sensibilidade da ALA-D ao HgCl_2 após a pré-incubação indica que o ALA protege resíduos de cisteína presentes no sítio ativo da enzima, da inativação por mercúrio. A enzima de todos os tecidos estudados apresentou um comportamento similar em termos do efeito do HgCl_2 na presença de concentrações crescentes de BAL (0-500 μM).

MILLER & WOODS (1993) demonstraram que complexos mercúrio-tiol apresentam atividade pró-oxidante. Logo, o mecanismo pelo qual o BAL potencializa o efeito inibitório do HgCl_2 pode estar relacionado à oxidação de resíduos de cisteína essenciais para a ALA-D, pelo complexo Hg-BAL. PUTZER et al. (1995) observaram que o complexo mercúrio-BAL apresenta uma maior atividade biológica do que os seus componentes isolados. Por outro lado, o BAL poderia remover íons zinco da ALA-D, tornando a enzima mais susceptível à oxidação (TSUKAMOTO et al., 1979) e à inibição por mercúrio. O BAL 500 μM , quando pré-incubado com a ALA-D, protegeu a enzima da inibição por cloreto de mercúrio. No entanto, esta concentração de BAL causa uma inibição de 50 e 40% na atividade da ALA-D renal e hepática, respectivamente. Uma proteção similar foi observada para a enzima cerebral, contudo a enzima de cérebro não foi inibida por 500 μM de BAL.

Estes resultados indicam que talvez a utilização de uma dose maior de BAL, *in vivo*, poderia ter sido capaz de reverter a inibição da ALA-D pelo mercúrio. Todavia, com a utilização de uma dose maior de BAL, os efeitos tóxicos do BAL *per se* certamente seriam maiores.

4.3 - Mecanismo de inibição da ALA-D pelo BAL

4.3.1- Papel do zinco na inibição da ALA-D pelo BAL

A determinação da concentração de zinco livre e do efeito do zinco na inibição da ALA-D pelo BAL demonstraram que o BAL quelata zinco nas nossas condições de incubação e que a inibição da ALA-D renal e hepática pelo BAL pode ser completamente revertida por zinco. As análises polarográficas revelaram que apesar da forma reduzida do BAL apresentar uma maior afinidade pelo zinco, a forma oxidada deste composto também quelata zinco. A constante de estabilidade do complexo Zn-BAL, calculada no intervalo de pH entre 3,30-3,78, utilizando-se uma solução de BAL no estado reduzido é de aproximadamente 10^{13} (LEUSSING & TISCHER, 1960). Em soluções mais alcalinas forma-se um complexo solúvel $Zn(BAL)_2^-$, o qual apresenta uma constante de estabilidade maior ($\cong 10^{23}$) (LEUSSING & TISCHER, 1960). Por outro lado a constante de associação aparente da ALA-D de fígado bovino com o zinco, em pH 6,8, é da ordem de 10^6 (SOMMER & BEYERSMANN, 1984). Estes resultados indicam que o BAL inibe a ALA-D através da remoção de íons zinco essenciais à atividade da enzima. No entanto, como a ALA-D é uma enzima altamente conservada na natureza (SHEMIN, 1976), esta hipótese não explica porque a atividade da ALA-D cerebral não é inibida pelo BAL.

O papel do zinco na ALA-D não está completamente elucidado. Existem estudos que atribuem uma função catalítica direta ao zinco (BEYERSMANN & COX, 1984; SOMMER & BEYERSMANN, 1984), enquanto outros corroboram a hipótese de que o zinco estabiliza a forma ativa da enzima, possivelmente por impedir a oxidação de grupos -SH essenciais à ALA-D (TSUKAMOTO et al., 1979; GIBBS et al., 1985). No presente estudo, demonstrou-se que a inibição da ALA-D por EDTA (até $40 \mu\text{M}$), a qual ocorre devido à remoção de íons zinco da enzima, pode ser revertida por DTT (10 mM). Este resultado demonstra que a remoção de zinco da ALA-D de camundongos torna a enzima mais susceptível à oxidação e que esta oxidação pode ser evitada pela adição de um agente redutor. A inibição da ALA-D por BAL (até 1 mM) também foi revertida por DTT, no entanto, o mesmo não ocorreu com a inibição da ALA-D por EDTA em concentrações maiores que $40 \mu\text{M}$. Provavelmente, concentrações de EDTA maiores que $40 \mu\text{M}$ são capazes de remover íons zinco mais

firmemente ligados à ALA-D e que não estão envolvidos na manutenção da enzima no seu estado reduzido. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados com ALA-D de *Escherichia coli* (SPENCER & JORDAN, 1993) e indicam que os dois sítios para zinco detectados na ALA-D (DENT et al., 1990), provavelmente, possuem funções diferenciadas. Se estas conclusões estão corretas, o BAL inibiria a ALA-D por remover o zinco ligado ao sítio mais lábil, o qual seria responsável por proteger grupos -SH essenciais da ALA-D contra oxidação. Estes resultados diferem de dados da literatura, que demonstram que a ALA-D contendo apenas 4 íons zinco/octâmero, ainda apresenta atividade máxima (zinco ligado apenas ao sítio mais estável, sítio A) (BEVAN et al., 1980; JAFFE et al., 1984). No entanto, pode-se explicar esta divergência pelo fato de que estes resultados da literatura foram obtidos com a presença de altas concentrações (5-10 mM) de um agente redutor (2-mercaptoetanol ou ditioneitol), o que provavelmente protegeu a enzima da oxidação. Além disso, o fato do BAL só inibir a ALA-D quando pré-incubado com a enzima indica que esses grupos -SH estabilizados pelo zinco devem estar próximos ao sítio ativo da ALA-D, uma vez que o ALA é capaz de prevenir esta inibição. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados com ALA-D de fígado bovino (BEYERSMANN & COX, 1984) demonstrando uma grande proximidade entre o sítio para zinco e o sítio de ligação do substrato.

4.3.2 - Papel da oxidação do BAL no seu efeito inibitório sobre a ALA-D

O BAL é um ditiol, que devido a fatores estéricos é prontamente oxidado na presença de agentes oxidantes (BARRON et al., 1947; PHILIPSON, 1962), o que poderia contribuir para o efeito inibitório deste composto.

Demonstrou-se que o BAL se oxida nas condições de ensaio da ALA-D (Figura 13). Assim, tanto o BAL oxidado, quanto espécies ativas de oxigênio, formadas durante a oxidação do BAL, poderiam inibir a ALA-D.

Os nossos resultados demonstraram que o IC₅₀ para inibição da ALA-D de rim e fígado pelo BAL previamente oxidado é maior que o IC₅₀ para inibição dessas enzimas pelo BAL reduzido. O ZnCl₂ (25 µM, dados não mostrados) não foi capaz de reverter a inibição da ALA-D de cérebro, fígado e rim de camundongos pelo BAL previamente oxidado, indicando que o mecanismo pelo qual esta forma do composto inibe a ALA-D é diferente daquele envolvido na inibição da enzima pela forma reduzida do BAL. A inibição da ALA-D pelo BAL oxidado provavelmente é devido a uma reação

de oxi-redução na qual o BAL se reduziria as custas da oxidação da ALA-D. O potencial de oxi-redução do BAL é -0,150 V (BARRON et al., 1947) e, apesar de o potencial de oxi-redução da ALA-D não ter sido determinado, parece estequiometricamente provável que nas condições de ensaio da atividade da enzima na presença de BAL oxidado ocorra uma oxidação da enzima por este composto, uma vez que a concentração de BAL oxidado presente no ensaio (0,5-1,0 mM) é muito superior a concentração estimada de enzima (da ordem de nM).

A concentração de BAL oxidado que é formada durante a incubação da ALA-D (150-300 μ M, dependendo do tempo de incubação), é menor que a concentração de BAL oxidado capaz de inibir a enzima. No entanto, não se pode descartar que a remoção de zinco da ALA-D pela porção de BAL que permanece na sua forma reduzida torne a enzima mais susceptível à oxidação e a inibição pelo BAL oxidado.

A solução de BAL previamente oxidado provavelmente não continha maior quantidade de espécies ativas de oxigênio que a solução de BAL reduzido, uma vez que estas espécies são muito instáveis; logo, não se pode descartar a participação de espécies ativas de oxigênio, formadas durante a oxidação do BAL, na inibição da ALA-D por este composto.

Apesar de existirem algumas evidências de que o zinco possa atuar biologicamente como um antioxidante (TAMMY & BETTGER, 1990), este metal só foi capaz de reduzir a velocidade oxidação do BAL em concentrações 4 a 20 vezes maiores que aquelas capazes de reverter a inibição da ALA-D por este composto. Estes resultados descartam a possibilidade de que o zinco previna a inibição da ALA-D pelo BAL por impedir a oxidação deste composto.

A velocidade de oxidação do BAL em ausência de tecido foi reduzida pela adição de EDTA e⁻ foi quase completamente bloqueada (98%, dados não mostrados), quando o BAL foi incubado sob atmosfera de argônio, nas condições de ensaio da ALA-D. A incubação sob atmosfera de argônio também reduziu significativamente a velocidade de oxidação do BAL em presença de preparação tecidual (ALA-D parcialmente purificada de fígado de camundongo e ALA-D comercial purificada de fígado bovino) (dados não mostrados). Estes resultados parecem indicar que a oxidação do BAL não possui um papel preponderante na inibição da ALA-D por este composto, uma vez que o BAL inibiu a enzima mesmo nos ensaios realizados sob atmosfera de argônio (ALA-D parcialmente purificada de fígado e rim de camundongos

reativada, ALA-D não purificada de fígado de camundongos e ALA-D purificada de fígado bovino reativada).

4.3.3 - Participação de espécies ativas de oxigênio na inibição da ALA-D pelo BAL

A autooxidação de compostos tiólicos, em presença de oxigênio, gera peróxido de hidrogênio e os radicais superóxido, hidroxil e tiil (MISRA, 1974). Além disso, a oxidação enzimática (peroxidases) destes compostos (OLSEN & DAVIS, 1976; SVENSSON, 1988) também pode gerar radicais tiil (HARMAN et al., 1986). Estes radicais livres são agentes oxidantes, capazes de inibir enzimas que necessitem de grupos -SH reduzidos para exercer sua atividade (NAKANISHI et al., 1985). No entanto, os experimentos sobre o efeito do NADH, superóxido dismutase e manitol na taxa de oxidação do BAL e na inibição da ALA-D pelo BAL revelam que os radicais hidroxil ($\text{OH}\cdot$) e superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) não possuem um papel significativo, nem no mecanismo de oxidação do BAL em presença de tecido, nem na inibição da ALA-D pelo BAL. Apesar disso não se pode descartar a participação de radicais livres centrados em carbono ou em enxofre (radicais tiil) na inibição da ALA-D pelo BAL.

4.3.4 - Efeito do BAL na atividade da ALA-D parcialmente purificada

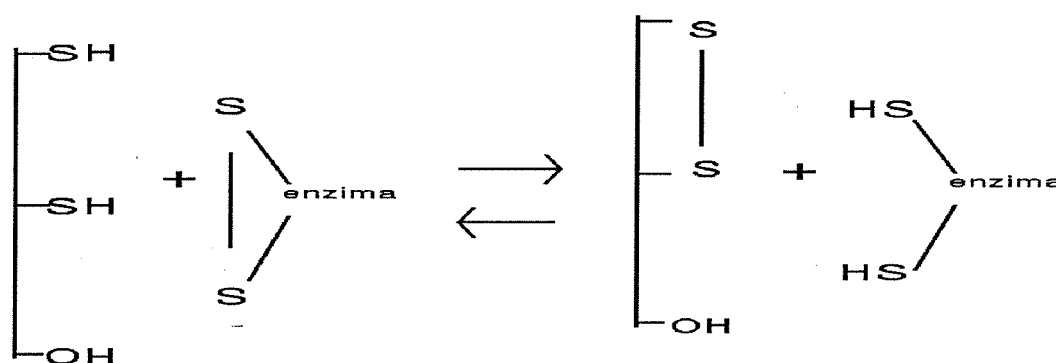
A ALA-D é uma enzima que apresenta estrutura e propriedades semelhantes nos diversos tecidos de mamíferos, variando apenas a sua concentração. Assim sendo, realizou-se uma purificação parcial da ALA-D de rim e fígado de camundongos, em uma tentativa de eliminar algum fator tecidual, ausente em cérebro, e que estivesse contribuindo para a inibição da ALA-D pelo BAL.

A ALA-D purificada e não reativada de fígado de camundongos foi inibida apenas por 29 mM de BAL, enquanto que 0,5 e 1 mM de BAL provocaram um aumento na atividade desta enzima. Estes resultados levavam a crer que o fator tecidual que estaria contribuindo para inibição desta enzima por baixas concentrações de BAL havia sido eliminado. No entanto, como a atividade específica da ALA-D purificada armazenada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ estava diminuindo a cada dia, ficando bem abaixo da atividade máxima daquela preparação tecidual (atividade na presença de 10 mM de DTT e 10 μM de ZnCl_2), realizou-se uma reativação da enzima antes de iniciar a reação enzimática. As

enzimas de fígado e de rim de camundongos purificadas e reativadas comportaram-se de modo idêntico às enzimas não purificadas. Além disso, a ALA-D de fígado bovino purificada pela Sigma, reativada, também é inibida pelo BAL. Estes resultados indicam que provavelmente a inibição da ALA-D pelo BAL não se deve a fatores teciduais específicos de rim e fígado.

A ALA-D cerebral sofreu uma ativação por 10 mM de DTT, que foi muito maior que a observada para as enzimas renal e hepática (Figuras 12A, B e C). Isto indica que a enzima cerebral é mais sensível a oxidação e/ou à perda de zinco, com consequente perda de atividade, durante a preparação tecidual, do que as enzimas de fígado e rim. Isto pode ser explicado pela existência de um maior potencial pró-oxidante e/ou menos mecanismos de defesa antioxidante no cérebro (REITER, 1995) do que em outros tecidos. Assim sendo, a ativação da enzima cerebral não purificada, em presença do BAL, pode ser explicada pela ação redutora deste ditiol sobre a enzima que estava previamente oxidada. O mesmo raciocínio explica a ativação da ALA-D de fígado de camundongos semi-purificada e não reativada, pelo BAL.

Estes resultados levam a crer que exista um equilíbrio entre o efeito inibidor do BAL por remoção de íons zinco tornando a enzima mais susceptível a oxidação e o seu efeito ativador sobre a ALA-D por redução de grupos -SH da enzima. Este efeito ativador pode ser ilustrado pela seguinte reação:



Se é grande a concentração de enzima na forma oxidada em relação a sua forma reduzida, o equilíbrio da reação seria deslocado para a direita com redução da ALA-D oxidada pelo BAL, provocando um aumento na atividade da enzima. Assim, quando a preparação enzimática colocada em contato com o BAL apresenta baixa atividade, por já estar oxidada (ALA-D cerebral não purificada e ALA-D hepática parcialmente purificada e não reativada) (Figuras 12A e 17, respectivamente), predomina o efeito

ativador do BAL. A enzima cerebral apresentou um aumento de 3 vezes na sua atividade em presença de 500 μM de DTT. Considerando que um aumento similar poderia estar ocorrendo na presença de 500 μM de BAL, este aumento encobriria a inibição da ALA-D cerebral por remoção de zinco, uma vez que nos outros tecidos esta inibição foi de aproximadamente 50%. Os resultados apresentados na figura 12A corroboram esta conclusão, uma vez que na presença de 500 μM de DTT, concentração que aumenta 3,5 vezes a atividade da ALA-D cerebral, observou-se uma inibição (50%) da ALA-D pelo BAL (1mM). Por outro lado, quando existe uma maior quantidade de enzima na forma reduzida, o efeito inibitório do BAL por remoção de zinco não seria encoberto, pois a preparação enzimática apresenta uma atividade próxima de sua atividade máxima.

Os resultados dos experimentos sobre o efeito do BAL na atividade das enzimas purificada, parcialmente purificada e não-purificada sob atmosfera natural ou sob atmosfera de argônio indicam que a inibição da ALA-D pelo BAL não é dependente de oxigênio.

5.0 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que:

- Utilizando como parâmetro a atividade da ALA-D, o tecido cerebral se apresentou menos sensível à intoxicação com cloreto de mercúrio do que os tecidos renal e hepático.

- A ALA-D de cérebro, fígado e rim de camundongos apresentaram sensibilidades semelhantes ao cloreto de mercúrio, *in vitro*. No entanto, *in vivo*, a suscetibilidade dessas enzimas à inibição por cloreto de mercúrio foi diferenciada, provavelmente devido a diferenças na distribuição tecidual deste metal.

- O BAL não protegeu a enzima sulfidrílica ALA-D da inibição por mercúrio após intoxicação com este metal *in vivo*.

- O BAL aumentou a toxicidade do mercúrio a nível molecular, tanto *in vivo* (atividade da ALA-D renal), quanto *in vitro* (atividade da ALA-D cerebral, renal e hepática).

- O BAL *per se* exerceu um efeito inibitório sobre a ALA-D renal, *in vivo*, e sobre a ALA-D renal e hepática, *in vitro*, o que evidencia a toxicidade deste composto.

- A ALA-D de camundongos, assim como previamente descrito para a ALA-D de *E. coli* (SPENCER & JORDAN, 1994), parece possuir sítios de ligação com afinidades diferentes pelo zinco e com funções diferenciadas. Assim, demonstrou-se que o zinco ligado ao sítio mais lábil está envolvido na proteção de grupos -SH essenciais da ALA-D contra oxidação.

- A inibição da ALA-D pelo BAL foi independente da presença de oxigênio.

- A inibição da ALA-D de fígado e rim de camundongos pelo BAL, *in vitro*, foi devido a remoção de íons zinco ligados ao sítio mais lábil, tornando a enzima mais susceptível a oxidação. Entretanto, como não foi testado o efeito de "scavengers" de radicais tiólicos na inibição da ALA-D pelo BAL, não se pode descartar a participação destes radicais, os quais podem ser gerados durante a oxidação do BAL, na oxidação da enzima.

- Os grupos -SH que são estabilizados pelo zinco ligado ao sítio mais lábil da enzima parecem estar localizados próximos ao sítio ativo da ALA-D, pois o ALA (reação sem pré-incubação) protegeu a enzima da inibição pelo BAL.

- Uma vez que o mercúrio inibiu a ALA-D por se ligar a grupos -SH da enzima, conclui-se que o efeito potencializante do BAL sobre a inibição da ALA-D por mercúrio pode estar relacionado a remoção de íons zinco da ALA-D, que aumentaria a susceptibilidade dos grupos -SH da enzima à oxidação por mercúrio.

- Existe um equilíbrio entre o efeito inibidor do BAL, por remoção de íons zinco, tornando a enzima mais susceptível a oxidação e o seu efeito ativador sobre a ALA-D por redução de grupos -SH da enzima. Assim, quando a preparação enzimática colocada em contato com o BAL apresenta baixa atividade por já estar oxidada (ALA-D cerebral não purificada e ALA-D hepática parcialmente purificada, não reativada), predomina o efeito ativador do BAL.

6.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AASETH, J.; ALEXAND, J. & RAKNERUD, N. Treatment of mercuric chloride poisoning with dimercaptosuccinic acid and diuretics: Preliminary studies. J. Toxicol.-clin. Toxicol. 19: 173-186 (1982).
- AASETH, J. Recent advance in the therapy of metal poisonings with chelating agents. Hum. Toxicol. 2(2): 257-272 (1983).
- AGNER, E. & JANS, H. Mercury poisoning and nephrotic syndrome in two young siblings. Lancet 28: 951 (1978).
- AMAZARRAY, M.T.R. Efeito de metais pesados em plantas: delta- aminolevulinato desidratase em *Ricinus communis*. Porto Alegre, Curso de Pós-graduação em Ecologia, UFRGS, 1986. Dissertação de Mestrado.
- ANNER, B.M.; MOOSMAYER, M. & IMESCH, E. Chelation of mercury by ouabain-sensitive and ouabain-resistant renal (sodium, potassium)-ATPase. Biochemical and Biophys. Res. Commun. 167(3): 1115-1121 (1990).
- APOSHIAN, H.V. DMSA and DMPS - Water soluble antidotes for heavy metal poisoning. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23: 193-215 (1983).
- APOSHIAN, H.V.; MAIORINO, R.M.; GONZALEZ-RAMIREZ, D.; ZUNIGA-CHARLES, M.; XU, Z.; HURLBUT, K.M.; JUNCO-MUNOZ, P.; DART, R.C. & APOSHIAN, M.M. Mobilization of heavy metals by newer, therapeutically useful chelating agents. Toxicology 97: 23-38 (1995).
- ARONSSON, M.A., LIND, B., NYLANDER, M. & NORDBERG, M. Dental amalgam and mercury. Biol. Metals 2: 25-30 (1989).
- BARIETY, J., DRUET, P., LALIBERTE, F. & SAPIN, C. Glomerulonephritis with gamma- and beta 1 C-globulin deposits induced in rats by mercuric chloride. Am. J. Pathol. 65: 293-302 (1971).
- BARNARD, G.F.; ITOH, R.; HOHBERGER, L.H. and SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase - Possible role of essential thiol groups. J. Biol. Chem. 252: 8965-8974 (1977).
- BARRON, E.S.G.; MILLER, Z.B. & KALNITSKY, G. The oxidation of dithiols. Biochem. J. 41(1): 62-68 (1947).
- BARREIRO, O.L.C. 5-Aminolaevulinate hydro-lyase from yeast. Isolation and purification. Biochim. Biophys. Acta 139: 479-486 (1967).
- BATLLE, A.M. del C.; FERRAMOLA, A.M.; GRINSTEN, M. Purification and general properties of delta-aminolaevulinate dehydratase from cow liver. Biochem. J. 104: 244-249 (1967).

- BATLLE, A.M. del C. & STELLA, A.M. Delta aminolaevulinate dehydratase: its mechanism of action. Int. J. Biochem. 9: 861- 864 (1978).
- BATTISTUZZI, G.; PETRUCCI, R.; SILVAGNI, L.; URBANI, F.R.; CAIOLA, S. Delta-aminolevulinate dehydratase: a new genetic polymorphism in man. Ann. Hum. Genet. 45: 223-229 (1981).
- BECHARA, E.J.H.; MEDEIROS, M.H.G.; MONTEIRO, H.P.; HERMES-LIMA, M.; PEREIRA, B.; DEMASI, M.; COSTA, C.A.; ABDALL, D.S.P.; ONUKI, J.; WENDEL, C.M.A. & MASCI, P.D. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. Química Nova. 16: 385-392 (1993).
- BELLINASSO, M.L. Estudo comparativo da delta-aminolevulinato desidratase em eritrócito humano e fígado de peixes (*Pimelodus maculatus*) e o efeito de metais pesados. Porto Alegre, Curso de Pós-graduação em Bioquímica, UFRGS, 1985. Dissertação de Mestrado.
- BERG, J.M. Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. Science 232: 485-487 (1986).
- BERLIN, M. & JOHANSSON, L.G. Mercury in mouse brain after inhalation of mercury vapor and after intravenous injection of mercury salts. Nature 204: 85-86 (1964).
- BERLIN, M., FAZACKERLEY, J. & NORDBERG, G. The uptake of mercury in the brains of mammals exposed to mercury vapor and mercuric salts. Arch. Environ. Health 18: 719-729 (1969).
- BERLIN, M. Mercury. Handbook on the Toxicology of Metals, vol. II eds L. Friberg, G.F. Nordberg and V.B. Vouk, pp. 387-435 (1986). Amsterdam: Elsevier.
- BEVAN, D.R.; BODLAENDER, P.; SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn^{2+} for enzyme activity. J. Biol. Chem. 255(5): 2030-2035 (1980).
- BEYERSMANN, D. & COX, M. Affinity labelling of 5-aminolevulinic acid dehydratase with 2-bromo-3-(5-imidazolyl)propionic acid. Biochim. Biophys. Acta 788: 162-168 (1984).
- BISHOP, T.R.; HODES, Z.I.; FRELIN, L.P. & BOYER, S.H. Cloning and sequence of mouse erythroid delta-aminolevulinate dehydratase cDNA. Nucleic Acid Research 17(4): 1775 (1989).
- BLOCK, C.; LOHMANN, R.D. and BEYERSMANN, D. Probing of active site residues of the zinc enzyme 5-aminolevulinate dehydratase by spin and fluorescence labels. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 371: 1145-1152 (1990).
- BLUHM, R.E.; BOBBIT, R.G.; WELCH, L.W.; WOOD, A.J.J.; BONFIGLIO, J.F.; SARZEN, C.; HEATH, A.J. & BRANCH, R.A. Elemental mercury vapour toxicity, treatment, and prognosis after acute, intensive exposure in chloralkali plant workers:

- Part I: History, neuropsychological findings and chelator effects. Human Exp. Toxicol. 11: 201-210 (1992).
- BOESE, Q.F.; SPANO, A.J.; LI, J. & TIMKO, M.P. Aminolevulinic acid dehydratase in pea (*Pisum sativum* L.). Identification of an unusual metal-binding domain in the plant enzyme. J. Biol. Chem. 266: 17060-17066 (1991).
- BORDER, E.A.; CANTRELL, A.C.; KILROE-SMITH, T.A. The *in vitro* effect of zinc and other metal ions on the activity of human erythrocyte aminolaevulinic acid dehydratase. Environ. Res. 11: 319-325 (1976).
- BORRALHO, L.M. Ácido delta-aminolevulínico desidratase de *Saccharomyces cerevisiae*: tópicos sobre as propriedades físico-químicas, cinéticas e regulatórias. Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, UFRJ, 1990. Tese de Doutorado.
- BORRALHO, L.M.; MALAMUD, D.R.; PANEK, A.D.; TENAN, M.N.; OLIVEIRA, D.E. & MATTOON, J.R. Parallel changes in catabolite repression of heme biosynthesis and cytochromes in repression-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 135: 1217-1227 (1989).
- BORRALHO, L.M.; ORTIZ, C.H.D.; PANEK, A.D. & MATTOON, J.R. Purification of delta-aminolevulinic acid dehydratase from genetically engineered yeast. Yeast 6: 319-330 (1990).
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976).
- BRENNAN, M.J.W. & CANTRILL, R.C. δ -Aminolaevulinic acid is a potent agonist for GABA autoreceptors. Nature (London) 280: 514-515 (1979).
- BROOKES, N. Specificity and reversibility of the inhibition by $HgCl_2$ of glutamate transport in astrocyte cultures. J. Neurochem. 50: 1117-1122 (1988).
- BROOKES, N. & KRISTT, D.A. Inhibition of amino acid transport and protein synthesis by $HgCl_2$ and methylmercury in astrocytes: selectivity and reversibility. J. Neurochem. 53: 1228-1237 (1989).
- BRUNE, D. & EVJE, D.M. Man's mercury loading from a dental amalgam. Sci. total Environ. 44: 51-63 (1985).
- CANTILENA, L.R., Jr. & KLAASSEN, C.D. Comparison of the effectiveness of several chelators after single administration on the toxicity, excretion and distribution of cadmium. Toxicol. Appl. Pharmacol. 58: 452-460 (1981).
- CANTONI, O.; EVANS, R.M. & COSTA, M. Similarity in the acute cytotoxic response of mammalian cells to mercury (II) and X-rays: DNA damage and glutathione depletion. Biochem. Biophys. Res. Commun. 108(2): 614-619 (1982).

- CANTONI, O. & COSTA, M. Correlations of DNA strand breaks and their repair with cell survival following acute exposure to mercury (II) and X-rays. Mol. Pharmacol. 24: 84-89 (1983).
- CANTONI, O.; CHRISTIE, N.T.; ROBISON, S.H. & COSTA, M. Characterization of DNA lesions produced by HgCl₂ in cell culture systems. Chem.-biol. Interact. 49: 209-224 (1984a).
- CANTONI, O.; CHRISTIE, N.T.; AWANN, A.; DRATH, D.B.; COSTA, M. Mechanism of HgCl₂ cytotoxicity in cultured mammalian cells. Mol. Pharmacol. 26: 360-368 (1984b).
- CHAUDHRY, A.G.; GORE, M.G. and JORDAN, P.M. Studies on the inactivation of 5-aminolevulinatase by alkylation. Biochem. Soc. Trans. 4: 301-303 (1976).
- CHEH, A. & NEILANDS, J.L. The delta-aminolevulinatase dehydratases: molecular and environmental properties. Struct. Bonding (Berlin) 29: 123-169 (1976).
- CHETTY, C.S.; COOPER, A.; MCNEIL, C.; RAJANNA, B. The effects of cadmium *in vitro* on adenosine triphosphatase system and protection by thiol reagents in rat brain microsomes. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 22(4): 456-458 (1992).
- CHINARRO, S.; STELLA, A.M.; BERGES, L.; SALAMANCA, R.E.; BATLLE, A.M. del C. Aminolevulinatase dehidrasa: propiedades y mecanismo de acción. N. Arch. Fac. Med. 41: 61-70 (1983).
- CHISOLM, J.J. Poisoning due to heavy metals. Pediatr. Clin. North. Am. 17: 591-61 (1970).
- CHOWDHURY, A.R.; VACHHRAJANI, K.D.; MAKHIJA, S. & AKSHYAP, S.K. Histomorphometric and biochemical changes in the testicular tissues of rats treated with mercuric chloride. Biomed. Biochim. Acta 45(7): 949-956 (1986).
- CHRISTIE, N.T.; CANTONI, O.; EVANS, R.M.; MEYEN, R.E. & COSTA, M. Use of mammalian DNA repair-deficient mutants to assess the effects of toxic metal compounds on DNA. Biochem. Pharmacol. 33(10): 1661-1670 (1984).
- CHRISTIE, N.T.; CANTONI, O.; SUGIYAMA, M.; CATTEBENI, F. & COSTA, M. Differences in the effects of Hg(II) on DNA repair induced in Chinese hamster ovary cells by ultraviolet or X-rays. Mol. Pharmacol. 29: 173-178 (1986).
- CLARKSON, T.W. & MAGOS, L. Studies on the binding of mercury in tissue homogenates. Biochem. J. 99: 62-70 (1966).
- CLARKSON, T.W.; MAGOS, L. & GREENWOOD, M.R. The transpost of elemental mercury into fetal tissues. Biol. Neonate 21: 239-244 (1972).
- CLOEZ, I.; DUMONT, O.; PICIOTTI, M. & BOURRE, J.M. Alterations of lipid synthesis in the normal and dysmyelinating trembler mouse sciatic nerve by heavy metals (Hg, Pb, Mn, Cu, Ni). Toxicology 46: 65-71 (1987).

- CORNELL, N.W. & CRIVARO, K.E. Stability constant for the zinc-dithiothreitol complex. Anal. Biochem. 47: 203-208 (1972).
- DASTON, G.P.; KAVLOCK, R.J.; ROGERS, E.H. & CARVER, B. Toxicity of mercuric chloride to the developing rat kidney I. Postnatal ontogeny of renal sensitivity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 71: 24-41 (1983).
- DENT, A.J.; BEYERSMANN, D.; BLOCK, C. and HASNAIN, S.S. Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinic acid dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. Biochem. 29: 7822-7828 (1990).
- DIXON, M. & WEBB, E.C. Enzymes, 2nd Ed, Longmans, London and Colchester, 1964, 950pp.
- DRESEL, E.I.B. & FALK, J.E. Conversion of delta-aminolaevulinic acid to porphobilinogen in a tissue system. Nature 172: 1185 (1953).
- DRUET, P.; DRUET, E.; POTDEVIN, F. & SAPIN, C. Immune type glomerulonephritis induced by HgCl₂ in the Brown Norway rat. Ann. Immunol. 129C: 777-792 (1978).
- DRUET, E.; SAPIN, C.; FOURNE, G.; MANDET, C.; GUNTHER, E. & DRUET, P. Genetic control of susceptibility to mercury-induced immune nephritis in various strains of rat. Clin. Immunopathol. 25: 203-212 (1982).
- DUNN, J.D.; CLARKSON, T.W. & MAGOS, L. Ethanol-increased exhalation of mercury in mice. Br. J. Ind. Med. 35: 241-244 (1978).
- DUNN, J.D.; CLARKSON, T.W. & MAGOS, L. Ethanol reveals novel mercury detoxification step in tissues. Science 213: 1123-1125 (1981a).
- DUNN, J.D.; CLARKSON, T.W. & MAGOS, L. Interaction of ethanol and inorganic mercury: Generation of mercury vapor *in vivo*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 216(1): 19-23 (1981b).
- ECHELARD, Y.; DYMETRYZYN, J.; DROLET, M. & SASARMAN, A. Nucleotide sequence of the hemB gene of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 214: 503-508 (1988).
- EICHHORN, G.L. & CLARK, P.G. The reaction of mercury (II) with nucleosides. J. Am. Chem. Soc. 85(24): 4020-4024 (1963).
- ELLENHORN, M.J. & BARCELOUX, D.G. Metals and related compounds. In: Medical Toxicology, pp. 1005-1065. New York, Elsevier, 1988.
- ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82: 70-77 (1959).
- ENDO, T. & SAKATA, M. Effects of sulfhydryl compounds on the accumulation, removal and cytotoxicity of inorganic mercury by primary cultures of rat renal cortical epithelial cells. Pharmacol. Toxicol. 76: 190-195 (1995).

- EYBL, V.; SYKORA, J.; KOUTENSKA, M.; KOUTENSKA, J. & MERTL, F. Effect of spironolactone, thiomestron and dimercaprol on the toxicity, retention and distribution of mercury in the mouse. Arzneim. -Forsch. 23: 867 (1973).
- FINELLI, V.N.; KLAUDER, D.S.; KARAFFA, M.A. and PETERING, H.G. Interaction of zinc and lead on delta-aminolevulinic acid dehydratase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65: 303-311 (1975).
- FISCHBEIN, A.; WALLACE, J.; ANDERSON, K.E.; SASSA, S. KON, S.; ROHL, A.N. & KAPPAS, A. Lead poisoning in an art conservator. J. Am. Med. Assoc. 247: 2007-2009 (1982).
- FRIBERG, L.; SKOG, E. & WAHLBERG, J.E. Resorption of mercuric chloride and methylmercury dicyandiamide in guinea-pigs through normal skin and through skin pre-treated with acetone, alkylarylsulphonate and soap. Acta Dermato-venerol. 41: 40-52 (1961).
- FRIBERG, L. & VOSTAL, J. Mercury in the environment: an epidemiological and toxicological appraisal. CRC Press, Inc., Cleveland, 1972.
- FRIBERG, L. & NYLANDER, M. The release and uptake of metallic mercury vapour from amalgam. In: Mercury/amalgam - health risks. Report by an expert group. Stockholm, National Board of Health and Welfare, Report series Social-styrelsen Redovisar 1987, 10, pp.65-79 (in Swedish with English summary).
- FRIDOVICH, I. Superoxide radicals and superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem. 64: 97-112 (1995).
- FUJITA, H.; ORII, Y.; SAND, S. Evidence of increased synthesis of delta-aminolevulinic acid dehydratase in experimental lead-poisoned rats. Bioch. Bioph. Acta 678: 39-50 (1981).
- GABARD, B. The excretion and distribution of inorganic mercury in rats as influenced by several chelating agents. Arch. Toxicol. 35: 15-24 (1976).
- GALE, T.F. & FERM, V.H. Embryopathic effects of mercuric salts. Life Sci. 10: 1341-1347 (1971).
- GANSER, A.L. & KIRSCHNER, D.A. The interaction of mercurials with myelin: Comparison of *in vitro* and *in vivo* effects. Neurotoxicology 6(1): 63-78 (1985).
- GIBBS, P.N.B.; GORE, M.G. & JORDAN, P.M. Investigation of the effect of metal ions on the reactivity of thiol groups in human 5-aminolaevulinic acid dehydratase. Biochem. J. 225: 573-580 (1985).
- GIBBS, P.N.B. & JORDAN, P.M. Identification of lysine at the active site of human delta-aminolaevulinic acid dehydratase. Biochem. J. 236: 447-451 (1986).
- GIBSON, K.D.; NEUBERGER, A.; SCOTT, J.J. The purification and properties of delta-aminolaevulinic acid dehydratase. Biochem. J. 61: 618-629 (1955).

- GOERING, P.L. Lead protein interactions as a basis for lead toxicity. Neurotoxicology 14: 45-60 (1993).
- GOMEZ, M.; SANCHEZ, D.J.; COLOMINA, M.T.; DOMINGO, J.L.; CORBELLA, J. Evaluation of the protective activity of 2,3-dimercaptopropanol and sodium 2,3-dimercaptopropane-1sulfonate on methylmercury-induced developmental toxicity in mice. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 26(1): 64-68 (1994).
- GOYER, R.A. Toxic effects of metals. In, Casarett and Doull 's Toxicology: The basic science of poisons, 3rd ed. (Klaassen, C.D.; Amdur, M.O.; and Doull, J.; eds.) Macmillan Publishing Co., New York, 1985.
- GRANICK, S. & MAUZERALL, D. Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. II. Enzymes converting delta-aminolevulinic acid to coproporphyrinogen. J. Biol. Chem. 232: 1119-1140 (1958).
- GRUENWEDEL, D.W. & DAVIDSON, N. Complexing and denaturation of DNA by methylmercuric hydroxide. I. Spectrophotometric studies. J. Mol. Biol. 21(1): 129-144 (1966).
- GUO, G.G.; GU, M. & ETLINGER, J.D. 24--kDa proteasome inhibitor (CF-2) is identical to delta-aminolevulinic acid dehydratase. J. Biol. Chem. 269(17): 12399-12402 (1994).
- HAND, W.C.; EDWARDS, B.S., CALEY, E.R. Pharmacology of mercury. III. Histochemical demonstration and differentiation of metallic mercury, mercurous mercury and mercuric mercury. J. Lab. Clin. Med. 28: 1835-1841 (1943).
- HARMAN, L.S.; CARVER, D.K.; SCHREIBER, J. and MASON, R.P. One- and two-electron oxidation of reduced glutathione by peroxidases. J. Biol. Chem. 261(4): 1642-1648 (1986).
- HASNIAN, S.S.; WARDELL, E.M.; GARNER, C.D.; SCHLOSSER, M. and BEYERSMANN, D. Extended-X-ray-absorption-fine-structure investigations of zinc in 5-aminolaevulinate dehydratase. Biochem. J. 230: 625-633 (1985).
- HERNEBERG, S.; NIKKANEN, J.; MELLIN, G.; LILIUS, H. Delta- aminolevulinic acid dehydratase as a measure of lead exposure. Arch. Environ. Health 21: 140-145 (1970).
- HILL, E.F. & SOARES, J.H. Subchronic mercury exposure in Coturnix and a method of hazard evaluation. Environ. Toxicol. Chem. 3: 489-502 (1984).
- HILMY, A.M.; EL-DOMIATY, N.A.; KAMAL, M.A.; MOHAMED, M.A. & ABOU SAMRA, W.E. Effect of some arsenic antagonists on the toxicity, distribution and excretion of arsenite and arsenate in rats. Comp. Biochem. Physiol. 99C(3), 357-362 (1991).
- HIRANO, H.; OMICHI, M.; OHISHI, H.; ISHIKAWA, K.; HIRASHIMA, N. The inhibition rate of delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in erythrocytes as a

- reliable index for individual workers of low lead exposure. Jap. J. Ind. Health 25(5): 432-437 (1983).
- HODSON, P.V.; BLUNT, B.R.; SPRY, D.J.; AUSTEN, K. Evaluation of erythrocyte delta-amino levulinic acid dehydratase activity as a short-term indicator in fish of a harmful exposure to lead. J. Fish. Res. Board Can. 33: 501-508 (1977).
- HOLT, D. & WEBB, M. The toxicity and teratogenicity of mercuric mercury in the pregnant rat. Arch. Toxicol. 58: 243-248 (1986).
- HOOVER, T.D. & APOSHIAN, H.V. Dimercaprol increases the arsenic-74 content of rabbit brain. Toxicol. Appl. Pharmacol. 70: 160-162 (1983).
- INNS, R.H.; RICE, P.; BRIGHT, J.E. & MARRS, T.C. Evaluation of the efficacy of dimercapto chelating agents for the treatment of systemic organic arsenic poisoning in rabbits. Hum. Exp. Toxicol. 9(4): 215-220 (1990).
- INNS, R.H. & RICE, P. Efficacy of dimercapto chelating agents for the treatment of poisoning by percutaneously applied dichloro(2-chlorovinyl)arsine in rabbits. Hum. Exp. Toxicol. 12(3): 241-246 (1993).
- JAFFE, E.K. & HANES, D. Dissection of the early steps in the porphobilinogen synthase catalysed reaction - Requirement for Schiff 's base formation. J. Biol. Chem. 261: 9348-9353 (1986).
- JAFFE, E.K.; SALOWE, S.P.; CHEN, N.T. & DE HAVEN, P.A. Porphobilinogen synthase modification with methylmethanethiosulfonate-A protocol for the investigation of metalloproteins. J. Biol. Chem. 259: 5032-5036 (1984).
- JORDAN, P.M.; GORE, M.G. and CHAUDHRY, A.G. Subunit modification of 5-aminolevulinic acid dehydratase involving cysteine residues. Biochem. Soc. Trans. 4: 762-763 (1976).
- JORDAN, P.M. & GIBBS, P.N.B. Mechanism of action of 5-aminolevulinic acid dehydratase from human erythrocytes. Biochem. J. 227: 1015-1020 (1985).
- JORDAN, P.M. & SEEHRA, J.S. Carbon-13 NMR as a probe for the study of enzyme-catalyzed reactions. Mechanism of action of 5-aminolevulinic acid dehydratase. FEBS Lett. 114: 283-286 (1980).
- JUGO, S. Retention and distribution of $^{203}\text{HgCl}_2$ in suckling and adult rats. Health Phys. 30: 240-241 (1976).
- JUGO, S. The efficiency of chelating agents in eliminating ^{203}Hg from the bodies of young and adult rats. Health Physics 38: 682-682 (1980).
- KAGI, J.H.R. & VALLEE, B.L. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. J. Biol. Chem. 235: 3460-3465 (1960).

- KANLUEN, S. & GOTTLIEB, C.A. A clinical pathologic study of four adult cases of acute mercury inhalation toxicity. Arch. Pathol. Lab. Med. 115(1): 56-60 (1991).
- KAPPAS, A.; SASSA, S. & ANDERSON, K.E. In: The Metabolic Basis of Inherited Disease, eds. Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (McGraw Hill, New York), pp. 1340-1341 (1983).
- KAZANTZIS, G. Diagnosis and treatment of metal poisoning - general aspects. In: Handbook on the toxicology of metals. eds Friberg, L.; Nordberg, G.F. & Vouk, V.B., pp.309-311. Amsterdam:Elsevier, 1986.
- KIDO, T. & SODA, K. Oxidation of anionic nitroalkanes by flavoenzymes, and participation of superoxide anion in the catalysis. Arch. Biochem. Biophys. 234(2): 468-475 (1984).
- KIYOZUMI, M.; SHIMADA, H.; HONDA, T. & KOJIMA, S. Studies on poisonous metals. XIX. Comparative effects of chelating agents on distribution and excretion of inorganic mercury in rats. Chem. Pharm. Bull. 36(7): 2599-2606 (1988).
- KLAASSEN, C.D. Biliary excretion of metals. Drug Metabolism Review 5: 165-196 (1976).
- KLAASSEN, C.D. Heavy metals and heavy-metal antagonists. In The Pharmacological Basis of Therapeutics. Eds. M.J. Wonsiewicz and P. McCurdy pp. 1649-1671. New York: McGraw-Hill, 1996.
- KOJIMA, S.; SHIMADA, H. & KIYOZUMI, M. Comparative effects of chelating agents on distribution, excretion, and renal toxicity of inorganic mercury in rats. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 64(3): 471-484 (1989).
- KOMULAINEN, H. & TUOMISTO, J. Interference of methyl mercury with monoamine uptake and release in rat brain synaptosomes. Acta Phamacol. Toxicol. 48: 214-222 (1981).
- KOMULAINEN, H. & TUOMISTO, J. ³H-Dopamine uptake and ³H-haloperidol binding in striatum after administration of methyl mercury to rats. Arch. Toxicol. 57: 268-271 (1985).
- KOSTIAL, K.; KELLO, D.; JUGO, S.; RABAR, I. & MALJKOVIC, T. Influence of age on metal metabolism and toxicity. Environ. Health Perspect. 25: 81-86 (1978).
- KOSTIAL, K.; SIMINOVIC, I.; RABAR, I.; BLANUSA, M. & LANKEDA, M. Age and intestinal retention of mercury and cadmium in rats. Environ. Res. 31: 111-115 (1983).
- KOSTIAL, K.; KARGACIN, B. & LANDEKA, M. 2,3-Dimercaptopropane-1-sodium sulfonate for reducing retention of ingested ²⁰³Hg in suckling rats. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 40: 185-188 (1988).

- KRISTENSEN, P. & HANSEN, J.C. Urinary and fecal excretion of selenium ($\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_3$) and mercury ($^{203}\text{HgCl}_2$) administered separately and simultaneously to mice. Toxicology 16: 39-47 (1980).
- LEE, I.P. & DIXON, R.L. Effects of mercury on spermatogenesis studied by velocity sedimentation cell separation and serial mating. J. Pharmacol. Exp. Ther. 194(1): 171-181 (1975).
- LEUSSING, D.L. and TISCHER, T.N. Mononuclear and polynuclear complex formation by manganese (II) and zinc (II) ions with 2,3-dimercapto-1-propanol: The behavior of the E_r function with mercaptide. J. Am. Chem. 83: 65-70 (1961).
- LI, J.M.; RUSSELL, C.S., COSLOY, S.D & SHARON, D.. The structure of the Escherichia coli hemB gene. Gene 75: 177-184 (1989).
- LIND, B.; FRIBERG, L. & NYLANDER, M. Preliminary studies on methylmercury biotransformation and clearance in the brain of primates: II. Demethylation of mercury in brain. J. Trace Elem. Exp. Med. 1: 49-56 (1988).
- LITCHFIELD Jr., J.T. & WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Therap. 96: 99-113 (1949).
- LONGCOPE, W.T. & LUETSCHER, J.A. Clinical uses of 2,3-dimercaptopropanol (BAL). XI: The treatment of acute mercury poisoning by BAL. J. Clin. Invest. 25: 557 (1946).
- LORSCHIEDER, F.L.; VIMY, M.J.; SUMMERS, A.O. & ZWIERS, H. The dental amalgam mercury controversy - inorganic mercury and the CNS; genetic linkage of mercury and antibiotic resistances in intestinal bacteria. Toxicology 97: 19-22 (1995).
- MAGOS, L.; HALBACH, S. and CLARKSON, T.W. Role of catalase in the oxidation of mercury vapor. Biochem. Pharmacol. 27: 1373-1377 (1978).
- MAGOS, L.; SPARROW, S. & SNOWDEN, R. The comparative neurotoxicology of phenylmercury and mercuric chloride. Arch. Toxicol. 50: 133-139 (1982).
- MAIORINO, R.M.; DART, R.C.; CARTER, D.E. & APOSHIAN, H.V. Determination and metabolism of dithiol chelating agents. XII. Metabolism and pharmacokinetics of sodium 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate in humans. J. Pharmacol. Exp. Therap. 259(2): 808-814 (1991).
- MANT, T.G.K.; LEWIS, J.L.; MATTOO, T.K.; RIGDEN, S.P.A.; VOLANS, G.N.; HOUSE, I.M.; WAKEFIELD, A.J. & COLE, R.S. Mercury poisoning after disc-battery ingestion. Hum. Toxicol. 6(2): 179-181 (1987).
- MILLER, D.M. & WOODS, J.S. Redox activities of mercury-thiol complexes: implications for mercury induced porphyria and toxicity. Chem. Biol. Interactions. 88: 23-35 (1993).

- MISRA, H.P. Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols. J. Biol. Chem. 249: 2151-2155 (1974).
- MIYAMOTO, M.D. Hg²⁺ causes neurotoxicity at an intracellular site following entry through Na and Ca channels. Brain Res. 267: 375-379 (1983).
- MOLINA, J.A.; CALANDRE, L.; BERMEJO, F. Myoclonic encephalopathy due to bismuth salts: Treatment with dimercaprol and analysis of CFS transmitters. Acta-Neurol. -Scand. 79(3): 200-203 (1989).
- MØLLER-MADSEN, B. Localization of mercury in CNS of the rat. An autometallographic study. Pharmacol. Toxicol. 75(suppl.), 2-41 (1994).
- MONTEIRO, H.P.; ABDALLA, D.S.P.; AUGUSTO, O. & BECHARA, E.J.H. Free radical generation during δ -aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. Arch. Biochem. Biophys. 271(1): 206-216 (1989).
- NAKADA, S.; NOMOTO, A. & IMURA, N. Effect of methylmercury and inorganic mercury on protein synthesis in mammalian cells. Ecotoxicol. Environ. Saf. 4: 184-190 (1980).
- NAKANISHI, Y.; ISOHASHI, F.; MATSUNAGA, T. and SAKAMOTO, Y. Oxidative inactivation of an extramitochondrial acetyl-CoA hydrolase by autoxidation of L-ascorbic acid. Eur. J. Biochem. 152: 337-342 (1985).
- NANDI, D.L. δ -Aminolevulinic acid synthase of *Rhodopseudomonas spheroides*. Binding of pyridoxal phosphate to the enzyme. Z.Naturforsch. 33C: 799-800 (1978).
- NIELSEN, J.B. & ANDERSEN, O. Oral mercuric chloride exposure in mice: effects of dose on intestinal absorption and relative organ distribution. Toxicology. 59: 1-10 (1989).
- NIELSEN, J.B. & ANDERSEN, O. Disposition and retention of mercuric chloride in mice after oral and parenteral administration. J. Toxicol. Environ. Health. 30: 167-180 (1990).
- NIELSEN, J.B. & ANDERSEN, O. Effect of four thiol-containing chelators on disposition of orally administered mercuric chloride. Hum. Exp. Toxicol. 10: 423-430 (1991).
- NORSETH, T. and CLARKSON, T.W. Intestinal transport of ²⁰³Hg-labeled methylmercury chloride. Role of biotransformation in rats. Arch. Environ. Health 22: 568-577 (1971).
- NYLANDER, M.; FRIBERG, L. & LIND, B. Mercury concentration in the human brain and kidneys in relation to exposure from dental amalgam fillings. Swed. dent. J. 11:179-187 (1987).

- OEHME, F. Mechanisms of heavy metal inorganic toxicities. In Toxicity to heavy metals in the environment, part 1, pp. 69-86. New York:Marcel Dekker (1978).
- OGATA, M. & IKEDA, M. Mercury uptake by acatalasemic mice and their erythrocytes, lung and liver homogenates. Biochem. Pharmacol. 27: 1373-1377 (1978).
- OGATA, M.; IKEDA, M.; SUGATA, Y. *In vitro* mercury uptake by human acatalasemic erythrocytes. Arch. Environ. Health 34: 218-221 (1979).
- OLSEN, J. and DAVIS, L. The oxidation of dithiothreitol by peroxidases and oxygen. Biochim. Biophys. Acta 445: 324-329 (1976).
- OMATA, S.; HIRAKAWA, E.; DAIMON, Y.; UCHIYAMA, M.; NAKASHITA, H.; HORIGOME, T.; SUGANO, I. & SUGANO, H. Methylmercury-induced changes in the activities of neurotransmitter enzymes in nervous tissues of the rat. Arch. Toxicol. 51: 285-294 (1982).
- PALKIEWICZ, P.; ZWIERS, H. & LORSCHIEDER, F.L. ADP-ribosylation of brain neuronal proteins is altered by *in vitro* and *in vivo* exposure to inorganic mercury. J. Neurochem. 62: 2049-2052 (1994).
- PELLETIER, L.; PASQUIER, R.; ROSSERT, J. & DRUET, P. HgCl₂ induces nonspecific immunosuppression in Lewis rats. Eur. J. Immunol. 17: 49-54 (1987).
- PEREIRA, B.; CURI, R.; KOKUBUN, E. & BECHARA, J.H. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. J. Appl. Physiol. 72(1): 226-230 (1992).
- PERRY, R.P. & JACOBSEN, E.S. Gold induced encephalopathy: case report. J. Rheumatol. 11(2): 233-234 (1984).
- PETERS, R.A. & STOCKEN, L.A. British anti-lewisite (BAL). Nature 24: 616-619 (1945).
- PETRUCCI, R.; LEONARDI, A.; BATTISTUZZI, G. The genetic polymorphism of human delta-aminolevulinic acid dehydratase in Italy. Hum. Genet. 60: 289-290 (1982).
- PHILIPSON, L. On the oxidation of 2,3-dimercaptopropanol. Biochim. Biophys. Acta. 56: 375-377 (1962).
- PIIKIVI, L.; HÄNNINEN, H.; MARTELIN, T. & MANTERE, P. Psychological performance and long-term exposure to mercury vapors. Scand. J. Work Environ. Health. 10: 35-41 (1984).
- PUTZER, R.R.; ZHANG, Y.; PRESTERA, T.; HOLTZELAW, W.D.; WADE, K.L. & TALALAY, P. Mercurials and dimercaptans: synergism in the induction of chemoprotective enzymes. Chem. Res. Toxicol. 8: 103-110 (1995).
- REITER, R.J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. FASEB J. 9: 526-533 (1995).

- ROCHA, J.B.T.; FREITAS, A.J.; MARQUES, M.B.; PEREIRA, M.E.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D.O. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinic acid dehydratase of suckling rats. Brazilian J. Med. Biol. Res. 26: 1077-1083 (1993).
- ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E.; EMANUELLI, T.; CHRISTOFARI, R.S.; SOUZA, D.O. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. Toxicology 100: 27-37 (1995).
- RODRIGUES, A.L.S. Delta-aminolevulinato desidratase (E.C.: 4.2.1.24) em sangue de Pimelodus Maculatus (Pisces, Pimelodidae): características bioquímicas e efeito de metais pesados. Porto Alegre, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, UFRGS, 1987. Dissertação de Mestrado.
- RODRIGUES, A.L.; BELLINASSO, M.L. & DICK, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). Comp. Biochem. Physiol. V.94B: 65-69 (1989).
- RODRIGUES, A.L.S.; ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E. & SOUZA, D.O. δ -Aminolevulinic acid dehydratase activity in weaning and adult rats exposed to lead acetate. Bull. Environ. Contam. Toxicol. No prelo, 1996.
- RÖNNBÄCK, L. & HANSSON, E. Chronic encephalopathies induced by mercury or lead: aspects of underlying cellular and molecular mechanisms. Brit. J. Ind. Med. 49: 233-240 (1992).
- ROSES, O.E.; GARCIA-FERNANDEZ, J.C.; VILLAAMIL, E.C.; CAMUSSA, N.; MINETTI, S.A.; MARTINEZ DE MARCO, M.; QUIROGA, P.N.; RATTAY, P.; SASSONE, A. et al. Mass poisoning by sodium arsenite. Journal of Toxicology Clinical Toxicology 29(2): 209-214 (1991).
- ROTHSTEIN, A. & HAYES, A.D. Metabolism of mercury studied by isotope techniques. II. Body burden of mercury after single and multiple injections. U.S. A.t. Energy Comm. UR-556, 16 pp. (1959).
- ROTHSTEIN, A. Mercaptans, the biological targets for mercurials. In *Mercury, Mercurials and Mercaptans*, eds. M. W. Miller and T.W. Clarkson, pp. 68-95, Springfield, III.: Charles C. Thomas (1971).
- SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. Enzyme 28: 133-145 (1982).
- SASSA, S.; FUJITA, H. & KAPPAS, A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In: A. Kotyk, J. Skoda; V. Paces and V. Kostka (Eds), *Highlights of Modern Biochemistry*, VSP, Utrecht, Vol. 1, pp. 329-338 (1989).
- SAXENA, P.N.; RAZA, S.S.; ATRI, A.; AGARWAL, R.; GUPTA, S. & SAKSENA, M. Central hyperthermic effect of arsenic in rabbits. Ind. J. Med. Res. Section B 94(june): 241-245 (1991).

- SCHAUMBURG, A.; SCHNEIDER-POETSH, A.A.W. & ECKERSKORN, C. Characterization of plastid 5-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D, EC 4.2.1.24) from spinach (*Spinacia oleracea* L.) by sequencing and comparison with non plant ALA-D enzymes. Z. Naturforsch. 47C: 77-84 (1991).
- SCHWARTZ, J.G.; SNIDER, T.E. & MONTIEL, M.M. Toxicity of a family from vacuumed mercury. Am. J. Emerg. Med. 10(3): 258-261 (1992).
- SEYDOUX, F.; MALHOTRA, P.O. & BERNHARD, S.A. Half-site reactivity. Crit. Rev. in Biochem. 2: 227-257 (1974).
- SHEMIN, D. 5-Aminolaevulinic acid dehydratase: structure, function, and mechanism. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 273B: 109- 115 (1976).
- SHIMADA, H.; FUKUDOME, S.; KIYOZUMI, M.; FUNAKOSHI, T.; ADACHI, T.; YASUTAKE, A. & KOJIMA, S. Further study of effects of chelating agents on excretion of inorganic mercury in rats. Toxicology 77: 157-169 (1993).
- SINGER, A.J.; MOFFENSON, H.C.; CARACCIO, T.R.; ILASI, J. Mercuric chloride poisoning due to ingestion of a stool fixative. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 32(5): 577-582 (1994).
- SKOG, E. & WAHLBERG, J.E. A comparative investigation of the percutaneous absorption of metal compounds in the guinea-pig by means of the radioactive isotopes: ^{31}Cr , ^{36}Co , ^{63}Zn , $^{110\text{m}}\text{Cd}$, ^{203}Hg . J. Invest. Dermatol. 43: 187-192 (1964).
- SLIKKERVEER, A. ; JONG, H.B.; HELMICH, R.B. & DE WOLFF, F.A. Development of a therapeutic procedure for bismuth intoxication with chelating agents. J. Lab. Clin. Med. 119(5): 529-537 (1992).
- SNODGRASS, W.; SULLIVAN, J.B.Jr.; RUMACK, B.H.; HASHIMOTO, C. Mercury poisoning from home gold ore processing, use of penicillamine and dimercaprol. J. Am. Med. Assoc. 246(17): 1929-1931 (1981).
- SPENCER, P. & JORDAN, P. M. Purification and characterization of 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* and a study of the reactive thiols at the metal-binding domain. Biochem. J. 290: 79-287 (1993).
- SPENCER, P. & JORDAN, P.M. Investigation of the nature of the two metal-binding sites in 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. Biochem. J. 300: 373-381 (1994).
- SPENCER, P. & JORDAN, P.M. Characterization of the two 5-aminolaevulinic acid binding sites, the A- and P-sites, of 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. Biochem. J. 305: 151-158 (1995).
- SIBBETT, D.J.; MOYER, R.H.; MILLY, G.H. Emission of mercury from latex paints. Amer. Chem. Soc., Div. Water, Air Waste Chem., Gen. Pap. 12(1): 20-26 (1972).

- SOMMER, R. & BEYERSMANN, D. Zinc and cadmium in 5-aminolevulinic acid dehydratase. Equilibrium, kinetic, and ^{113}Cd -nmr-studies. J. Inorg. Biochem. 20: 131-145 (1984).
- SUGATA, Y. & CLARKSON, T.W. Exhalation of mercury - further evidence for an oxidatio-reduction cycle in mammalian tissues. Biochem. Pharmacol. 28: 3473-3476 (1979).
- SVENSSON, B.E. Abilities of peroxidases to catalyse peroxidase-oxidase oxidation of thiols. Biochem. J. 256: 757-762 (1988).
- SWENSSON, A. ULFVARSON, U. Distribution and excretion of mercury compounds in rats over a long period after a single injection. Acta Pharmacol. Toxicol. 26: 273-283 (1968).
- SYVERSEN, T.M.L. Biotransformation of Hg^{203} -labelled methyl mercuric chloride in rat brain measured by specific determination of Hg^{2+} . Acta Pharmacol. Toxicol. 35: 277-283 (1974).
- TAKEUCHI, T.; MORIKAWA, N.; MATSUMOTO, M. & SHIRAIISHI, Y. A pathological study of Minamata disease in Japan. Acta Neuropathol. 2: 40-57 (1962).
- TAMY, M.B. & BETTGER, W.J. The physiological role of zinc as an antioxidant. Free Rad. Biol. Med. 8: 281-291 (1990).
- TANAKA, T.; NAGANUMA, A.; KOBAYASHI, K. & IMURA, N. An explanation for strain and sex differences in renal uptake of methylmercury in mice. Toxicology 69: 317-329 (1991).
- TARUI, S. Studies on zinc metabolism. Med. J. Osaka Univ. 10: 499-505 (1960).
- TIGIER, H.A.; BATLLE, A.M. del C.; LOCASCIO, G.A. Porphyrin biosynthesis in soybean callus tissue system. Isolation, purification and general properties of delta-aminolaevulinate dehydratase. Biochem. Biophys. Acta 151: 300-302 (1968).
- TIGIER, H.A.; BATLLE, A.M. del C.; LOCASCIO, G.A. Porphyrin biosynthesis in the soybean callus tissue system. II. Improved purification and some properties delta-aminolaevulinic acid -dehydratase. Enzymologia 38: 43-56 (1970).
- TROEN, P.; KAUFMAN, S.A. & KATZ, K.H. Mercuric bichloride poisoning. New Eng. J. Med. 244(13): 459-463 (1951).
- TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T.; and SANO, S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. Bioch. Bioph. Acta 570: 167-178 (1979).
- TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T.; SANO, S. Zinc and cysteine residues in the active site of bovine liver delta-aminolevulinic acid dehydratase. Int. J. Biochem. 12: 751-756 (1980).

- VALLEE, B.L. & ULMER, D.D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. Ann. Rev. Biochem. 41: 91-128 (1972).
- VERGNANO, C.; CARTASEGNA, C. & BONSIGNORE, D. Regolazione allosterica della attività delta-amino-levulinico-deidratasi eritrocitaria. - Nota I. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 64(7): 692-695 (1968).
- VIMY, M.J. & LORSCHIEDER, F.L. Intra-oral air mercury released from dental amalgam. J. Dent. Res. 64(8): 1069-1071 (1985a).
- VIMY, M.J. & LORSCHIEDER, F.L. Serial measurements of intra-oral air mercury: Estimation of daily dose from dental amalgam. J. Dent. Res. 64(8): 1072-1085 (1985b).
- VIMY, M.J.; TAKAHASHI, Y.; LORSCHIEDER, F.L. Maternal-fetal distribution of mercury (^{203}Hg) released from dental amalgam fillings. Am. J. Physiol. 258 (4, Pt. 2), R 939- R 945 (1990).
- WAHLBERG, J.E. "Disappearance measurements", a method for studying percutaneous absorption of isotope-labelled compounds emitting gamma-rays. Acta dermatovenerol. 45: 397-414 (1965).
- WANNAG, A. & AASETH, J. The effect of immediate and delayed treatment with 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate on the distribution and toxicity of inorganic mercury in mice and in foetal and adult rats. Acta Pharmacol. Toxicol. 46: 81 (1980).
- WATANABE, T.; SHIMADA, T. & ENDO, A. Effects of mercury compounds on the ovulation and meiotic and mitotic chromosomes in female golden hamster. Teratology 25: 381-384 (1982).
- WEENING, J.J.; FLEUREN, G.J. & HOEDEMAEKER, Ph.J. Demonstration of antinuclear antibodies in mercuric chloride-induced glomerulopathy in the rat. Lab. Invest. 39(4): 405-411 (1978).
- WETMUR, J.G. Influence of the common human delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on lead body burden. Environmental Health Perspectives 102, sup. 3: 215-219 (1994).
- WETMUR, J.G.; BISHOP, D.F.; CANTELMO, C. & DESNICK, R.J. Human delta-aminolevulinic acid dehydratase: Nucleotide sequence of a full-length cDNA clone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7703-7707 (1986).
- WHO Environmental Health Criteria I: Mercury, Geneva, World Health Organization, 131 pp. (1976).
- WHO Environmental Health Criteria 118: Inorganic Mercury, Geneva, World Health Organization, 167 pp. (1991).
- WILSON, E.L.; BURGER, P.E.; DOWDLE, E.B. Beef-liver 5-aminolevulinic acid dehydratase - Purification and properties. Eur. J. Biochem. 29: 563-571 (1972).

- WU, W.; SHEMIN, D.; RICHARDS, K.E.; WILLIAMS, R.C. The quaternary structure of delta-aminolevulinic acid dehydratase from bovine liver. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 1767-1770 (1974).
- YAMAMOTO, R.; SUZUKU, T. SATOH, H. & KAWAI, K. Generation and dose as modifying factors of inorganic mercury accumulation in brain, liver, and kidney of rats fed methylmercury. Environ. Res. 41: 309-318 (1986).
- ZALUPS, R.K. Method for studying the *in vivo* accumulation of inorganic mercury in segments of the nephron in the kidneys of rats treated with mercuric chloride. J. Pharmacol. Methods 26: 89-104 (1991).
- ZALUPS, R.K. & BARFUSS, D.W. Accumulation of inorganic mercury along the proximal tubule of the rabbit. Toxicol. Appl. Pharmacol. 106: 245-253 (1990).
- ZVIRBLIS, P. & ELLIN, R.I. Acute systemic toxicity of pure dimercaprol and trimercaptopropanol. Toxicol. Appl. Pharmacol. 36: 297-299 (1976).